

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Un nuovo modello computazionale
di fibra di Purkinje umana:
dal modello medio alla popolazione di modelli
e ritorno

Tesi in

BioIngegneria Molecolare e Cellulare Lm

Relatore

Prof. Stefano Severi

Presentata da

Cristian Trovato

Correlatori

Prof.ssa Blanca Rodriguez

Dott.ssa Elisa Passini

Sessione I

Anno Accademico 2015-2016

Alla mia famiglia
e
Alla mia famiglia allargata

Prefazione

Le **malattie cardiache e cardiovascolari** sono la causa principale di morte nel mondo e, in virtù di questo infausto primato, sono tra i temi su cui si concentra l'interesse di una variegata platea di saperi nella comunità scientifica internazionale. Tuttavia i meccanismi responsabili di **aritmie** o di altre malattie cardiache non sono ancora del tutto conosciuti, portando ad una minore efficacia delle terapie attualmente disponibili.

Nel mondo Occidentale, la produzione e la messa in commercio di nuove terapie farmacologiche per disturbi cardiaci quali aritmie atriali o ventricolari richiedono numerose, severe e complesse procedure di valutazione dell'efficacia e della **sicurezza del farmaco**: test *in vitro* e/o *in vivo* su modelli sperimentali animali che, a valle del processo di messa in commercio della terapia, rappresentano per l'Industria un esborso non indifferente. D'altronde le Istituzioni Sanitarie e gli enti Regolatori (come ad esempio l'FDA), col progredire della ricerca nel campo delle malattie cardiache, richiedono **procedure di valutazione** sempre più complesse, con l'obiettivo di avere risultati molto accurati e sempre più basati su modelli sperimentali umani, invece di quelli animali (topo, coniglio, cane).

Una valida risposta a queste esigenze è costituita dalle sperimentazioni virtuali, ovvero simulazioni *in silico* nell'ambito della **Biologia Computazionale**. Originata dalla sinergia tra *l'Ingegneria, le Scienze Informatiche e la Biologia*, l'oggetto di ricerca di questo recente campo tecnico-scientifico è, proprio, la simulazione *in silico* di sistemi fisici-biologici, approssimati attraverso l'uso di operatori matematici complessi, quali sistemi dinamici e discreti di equazioni algebriche e differenziali.

Il lavoro presentato in questa tesi è stato svolto presso il *Department of Computer Science, University of Oxford*, durante il mio periodo all'estero nel *Computational Biology Group*, guidato dalla Prof.ssa Blanca Rodriguez.

Scopo del presente lavoro è stato lo sviluppo di un modello matematico del **potenziale d'azione** per cellule umane cardiache di Purkinje. Tali cellule appartengono al sistema di conduzione elettrico del cuore, e sono considerate molto importanti nella genesi di aritmie, in quanto costituiscono un sistema di conduzione rapida.

Il modello, elaborato in linguaggio Matlab, è stato progettato utilizzando la tecnica delle *Popolazione di Modelli*, un innovativo approccio alla modellazione cellulare sviluppato recentemente proprio dal Computational Biology Group. Tale modello è stato sviluppato in 3 fasi:

- Inizialmente è stato sviluppato un nuovo modello matematico di cellula umana del Purkinje cardiaco, tenendo in considerazione i modelli precedenti disponibili in letteratura (formulati da *Stewart et al* e *Sampson et al*, rispettivamente nel 2009 e nel 2010) e le più recenti pubblicazioni in merito alle caratteristiche elettrofisiologiche proprie della cellula cardiaca umana di Purkinje. Tale modello è stato costruito a partire dall'attuale *gold standard* della modellazione cardiaca ventricolare umana, ovvero il modello pubblicato da *T. O'Hara* e *Y. Rudy* nel 2011, modificandone sia le specifiche correnti ioniche che la struttura interna cellulare.
- Il modello così progettato è stato, poi, utilizzato come “modello di base” per la costruzione di una popolazione di 3000 modelli, tramite la variazione di alcuni parametri del modello all'interno di uno specifico range. La popolazione così generata è stata calibrata sui dati sperimentali di cellule umane del Purkinje, provenienti da sette cuori umani, forniti dal gruppo di ricerca *Cardiovascular Pharmacology, Szeged University (Hungary)*, per selezionare soltanto i modelli con caratteristiche elettrofisiologiche attese, ovvero in linea con i dati sperimentali. A valle del processo di calibrazione si è ottenuta una popolazione di 76 modelli.
- A partire dalla popolazione rimanente, è stato ricavato un nuovo modello ai valori medi, che riproduce le principali caratteristiche del potenziale d'azione

di una cellula di Purkinje cardiaca umana, e che rappresenta il dataset sperimentale utilizzato nel processo di calibrazione.

Tale modello sarà utilizzato come punto di partenza per un nuovo studio nell'ambito del mio progetto di Dottorato presso il Dipartimento di Computer Science dell'Università di Oxford, volto ad investigare il ruolo delle fibre cardiache di Purkinje nella genesi di aritmie cardiache e la risposta a farmaci specifici.

Acronimi

P_m	<i>Potenziale di membrana.</i>
PA (AP)	<i>Potenziale d'azione (Action Potential).</i>
VC	<i>Voltage Clamp.</i>
ORd	<i>Modello ventricolare di O'Hara-Rudy.</i>
Nodo SA	<i>Nodo seno atriale.</i>
Nodo AV	<i>Nodo Atrioventricolare.</i>
APD	<i>Action Potential Duration.</i>
HPS	<i>His-Purkinje System.</i>
P-cells	<i>Cellule del Purkinje.</i>
VMs	<i>Cardiomiociti ventricolari.</i>
SR	<i>Sarcoplasmic Reticulum.</i>
JSR	<i>Junctional Sarcoplasmic reticulum.</i>
CSR	<i>Corbular Sarcoplasmatic Reticulum.</i>
NSR	<i>Network Sarcoplasmatic Reticulum.</i>
DADs	<i>Delayed After-Depolarization.</i>
EADs	<i>Early After-Depolarization.</i>
TT04	<i>Modello ventricolare di ten Tusscher (2004).</i>
TT06	<i>Modello ventricolare di ten Tusscher (2006).</i>
STW	<i>Modello di Purkinje umano di Stewart (2009).</i>
ORd	<i>Modello ventricolare umano di O'Hara e Rudy (2011).</i>
PRd	<i>Modello di Purkinje canino di Pan Li e Rudy (2012).</i>
POMs	<i>Popolazione di modelli.</i>

PCS	<i>Spazio Periferico di accoppiamento (Peripheral coupling subspace)</i>
SSL	<i>Compartimento sub-sarcolemmico (Subsarcolemmal Compartment)</i>
Myo (i)	<i>Compartimento centrale del mioplasma (Bulk Myoplasm Compartment)</i>
I_{Na}	<i>Corrente di sodio (fast Na^+ Current)</i>
$I_{Na,L}$	<i>Corrente di sodio ritardata (Slowly inactivating late-Na^+ Current)</i>
I_{to}	<i>Corrente transiente di potassio uscente (Outward transient K^+ current)</i>
I_{sus}	<i>Corrente sostenuta (Sustained current)</i>
$I_{Ca,L}$	<i>Corrente di calcio di tipo L (L-type Ca^{2+} current)</i>
$I_{Ca,T}$	<i>Corrente di calcio di tipo T (T-type Ca^{2+} current)</i>
I_{Kr}	<i>Corrente rapida ritardata rettificante di potassio (Rapid delay rectifier K^+ current)</i>
I_{Ks}	<i>Corrente lenta ritardata rettificante di potassio (Slow delay rectifier K^+ current)</i>
I_{K1}	<i>Corrente rettificante entrante di potassio (Inward rectifier K^+ current)</i>
I_f	<i>Corrente funny (Hyper-polarization activated $Na^+ - K^+$ current)</i>
I_{NaK}	<i>Pompa sodio-potassio ($Na^+ - K^+$ pump current)</i>
I_{NCX}	<i>Scambiatore sodio-calcio ($Na^+ - Ca^{2+}$ exchanger current)</i>

INDICE

PREFAZIONE	5
ACRONIMI	9
INTRODUZIONE	13
ANATOMIA DEL CUORE E MODELLIZZAZIONE CARDIACA	13
IL CUORE	13
IL POTENZIALE D'AZIONE CARDIACO	16
LE CELLULE DEL PURKINJE	18
CARATTERISTICHE BIOLOGICHE E ANATOMICHE	19
CARATTERISTICHE ELETTROFISIOLOGICHE	20
MECCANISMI PRO-ARITMICI NELLE P-CELLS	24
MODELLISTICA DEL POTENZIALE DI MEMBRANA	26
MODELLI CARDIACI DI PURKINJE: LO STATO DELL'ARTE	33
IL MODELLO DI STEWART	34
IL MODELLO DI SAMPSON	36
MATERIALI E METODI	39
DATI DI CELLULE UMANE DI PURKINJE	39
DATI SPERIMENTALI	39
DATI IN LETTERATURA	42
MODELLO COMPUTAZIONALE	44
POPOLAZIONE DI MODELLI	45
SIMULAZIONI	48
RISULTATI	49
MODELLIZZAZIONE DELLE CORRENTI IONICHE	49
CORRENTI IONICHE AGGIUNTE AL MODELLO ORD	49
CORRENTI IONICHE PRESENTI MA MODIFICATE	52
IL MODELLO DI BASE	57
POMs: POPOLAZIONE DI MODELLI	60
DALLA POPOLAZIONE AL MODELLO MEDIO	67

CONCLUSIONI	71
BIBLIOGRAFIA	73
APPENDICE A: EQUAZIONI E PARAMETRI DEL MODELLO	77
APPENDICE B: CODICE MATLAB	89
RINGRAZIAMENTI	101

Introduzione

Lo sviluppo di simulazioni al calcolatore, ovvero *in silico*, di sistemi biologici nasce dalla sinergia tra *l'Ingegneria*, *l'Informatica* e *la Biologia*. La prima mette a disposizione in un approccio multi-scala i metodi ingegneristici (basati su una descrizione semplificata dell'esistente attraverso la *Fisica* e la *Matematica*), mentre la seconda fornisce la potenza di calcolo, notevolmente aumentata negli ultimi anni, permettendo così simulazioni sempre più avanzate, per cercare di riprodurre, seppur in modo semplificato, la complessità dei sistemi biologici. Dalla sinergia di queste scienze nasce la **biologia computazionale**, il cui oggetto di ricerca è la simulazione *in silico* di sistemi fisici-biologici, approssimati attraverso l'uso di operatori matematici complessi, quali sistemi dinamici e discreti di equazioni algebriche e differenziali.

Anatomia del cuore e Modellizzazione cardiaca

Il cuore

Il cuore è un organo muscolare, grande circa come un pugno, situato al centro della cavità toracica, dietro lo sterno, sopra il diaframma, in mezzo ai polmoni. È avvolto in

un robusto sacco membranoso, il pericardio, una doppia membrana contenente il liquido pericardico, che riduce la frizione da sfregamento durante la contrazione cardiaca.

È suddiviso in 4 camere principali: le due camere inferiori, più larghe e spesse sono i ventricoli, mentre le camere superiori, più sottili e piccole sono chiamati atri. L'estremità inferiore dei ventricoli è chiamato apice, mentre la loro parte superiore è nota come base. Sia atri che ventricoli sono separati in compartimenti indipendenti, destro e sinistro, rispettivamente dal setto interatriale e da quello interventricolare.

Il sangue, privo di ossigeno e carico di biossido di carbonio, proveniente dalla periferia del corpo, si raccoglie nell'atrio destro. La contrazione dell'atrio spinge il sangue, attraverso la valvola tricuspide, nel ventricolo destro. Una successiva contrazione porta il sangue, attraverso la valvola semilunare polmonare, nei polmoni, ove il sangue rilascia biossido di carbonio e si ossigena. Il flusso ematico ossigenato rientra nell'atrio sinistro e, attraverso la valvola bicuspidale, si raccoglie nel ventricolo sinistro, per essere poi pompato nell'intero organismo. Proprio in virtù della maggiore pressione che il sangue necessita per raggiungere i distretti più periferici dell'organismo, il ventricolo sinistro presenta una muscolatura sensibilmente più spessa rispetto al destro.

La fase di contrazione di un ciclo cardiaco è detta *sistole*, la fase di rilassamento *diastole*. La sistole è provocata dall'attivazione elettrica del **miocardio**, la muscolatura specializzata del cuore, che presenta caratteristiche tipiche sia della muscolatura liscia sia di quella striata. Come nei muscoli scheletrici le fibre sono organizzate in sarcomeri (più corti, però, rispetto a quelli della muscolatura scheletrica), possono essere ramificate e hanno un singolo nucleo. Come le fibre muscolari lisce, invece, le fibre miocardiche sono accoppiate elettricamente attraverso le *giunzioni comunicanti*. Inoltre, alcune fibre miocardiche, come alcuni tipi di muscolo liscio, sviluppano *potenziali pacemaker*, ovvero PA auto-evocati dalla cellula.

Le principali cellule pacemaker del miocardio si trovano in cima all'atrio destro, in prossimità dello sbocco della vena cava superiore, e sono chiamate cellule del *nodo seno-atriale*. Queste cellule auto-depolarizzanti rappresentano il pacemaker più veloce del cuore, circa 70 battiti al minuto, e normalmente impongono la frequenza cardiaca. Da qui, l'onda di depolarizzazione si diffonde poi rapidamente, tramite un sistema di conduzione specializzato, verso un altro gruppo di cellule pacemaker: il

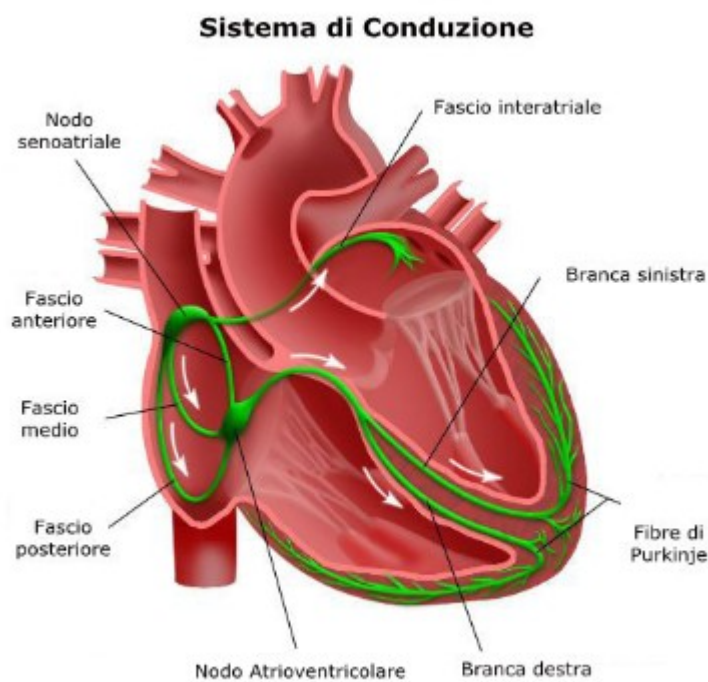


Figura I-1. Il sistema di conduzione del cuore, da Silverthorn, 2010.

situato nel setto interventricolare. Dopo un breve tratto, in prossimità dell'apice, il fascio di His si divide in una branca destra e una branca sinistra, dette anche di Tawara (Tawara *et al*, 2000). Le fibre delle due branche raggiungono l'apice cardiaco e danno origine a fibre di Purkinje più piccole, che si diramano tra le cellule contrattili dei ventricoli.

La propagazione dell'impulso elettrico è facilmente rilevabile, fase per fase, da un sistema di elettrodi di superficie ed un elettrocardiografo, analogico o digitale.

nodo atrio-ventricolare. Posto centralmente tra la superficie inferiore dell'atrio destro e la base del ventricolo destro, il nodo AV è il secondo pacemaker cardiaco e si depolarizza con una frequenza di 50 battiti al minuto.

Come mostrato in figura I-1, la depolarizzazione prosegue dunque attraverso le fibre del Purkinje del fascio atrio-ventricolare (fascio di His),

Il Potenziale d'Azione cardiaco

Il PA è responsabile della propagazione dell'eccitazione nelle cellule del miocardio, permettendo al cuore di lavorare (elettricamente e meccanicamente) come un sincizio funzionale.

Il potenziale d'azione presenta alcune caratteristiche tipiche, comuni a tutti i tipi di cellule eccitabili, a prescindere dalla loro tipologia:

1. **Presenza di una soglia.** Solo se il potenziale di membrana è perturbato oltre un certo valore (tipicamente tra i -65 e i -55mV), il potenziale d'azione si innesta. Finché il potenziale di membrana rimane inferiore al valore di soglia, la cellula si comporta come se fosse non- eccitabile;
2. Il PA ha una **forma stereotipata**, cioè del tipo “tutto o nulla”. Quindi, una volta superato il valore di soglia, la forma del potenziale d'azione diviene indipendente dallo stimolo. Partendo da una situazione di riposo compreso tra -90 e -70mV, una volta superato il valore di soglia, il potenziale d'azione sale rapidamente a valori positivi di potenziale (intorno ai +30/40 mV) e, dopo un'eventuale fase detta plateau, in cui il potenziale rimane a valori positivi, ritorna alla condizione di riposo.
3. Completata la dinamica del PA, esiste un intervallo temporale, detto **tempo refrattario assoluto**, durante il quale la cellula si comporta come se fosse non- eccitabile; non è più possibile generare il PA, nemmeno applicando elevati impulsi di corrente.
4. Al termine del tempo refrattario assoluto la cellula riacquista la capacità di eccitarsi. Tuttavia esiste un successivo periodo, detto **tempo refrattario relativo**, durante il quale occorre stimolare la cellula con impulsi di corrente più elevati per generare il potenziale d'azione.

Si riportano, in figura I-2, i potenziali d'azione dei principali tessuti cardiaci

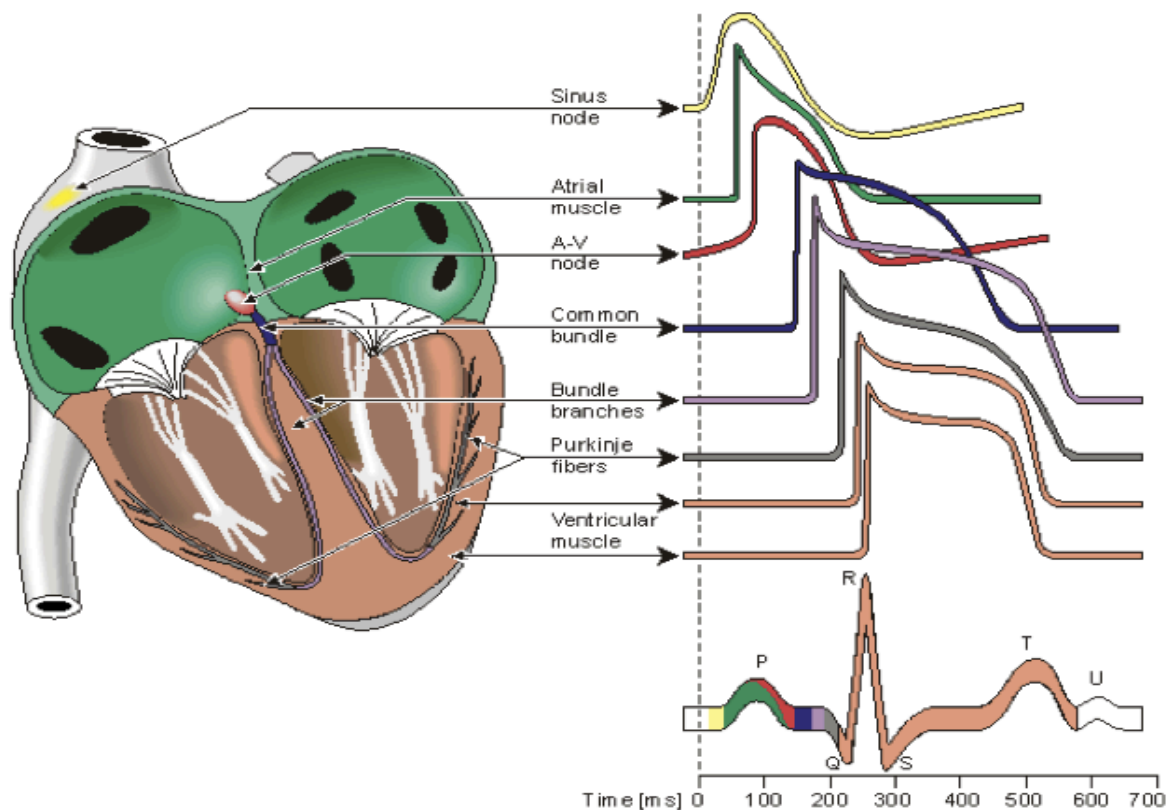


Figura I-2. PA nei diversi tessuti cardiaci e loro contributo al segnale ECG, modificata da Malmivuo *et al*, 1995.

Le cellule del nodo SA, così come quelle del nodo AV, presentano un potenziale diastolico più alto degli altri tessuti cardiaci, tipicamente da -50 a -60 mV, e una depolarizzazione lenta, dovuta principalmente all'ingresso di Ca^{2+} nella cellula.

Negli atri e nei ventricoli, il potenziale di membrana a riposo è di circa -80 mV e il PA presenta una fase di depolarizzazione molto veloce, attribuibile alla corrente entrante di Na^+ , e un picco di circa 30-50 mV.

Tuttavia i PA ventricolari e del Purkinje mostrano una minore velocità di ripolarizzazione e dunque un plateau maggiore, rispetto ai PA atriali. Inoltre la durata del PA (APD) ventricolare è minore sulla superficie esterna (epicardio), maggiore sulla superficie interna (endocardio) e massima nella parte centrale del tessuto muscolare del ventricolo. La maggiore durata del PA ventricolare (elevato APD) serve principalmente a due funzioni (M. Bers, 1993):

1. Prevenire eventuali eccitazioni da rientro, mantenendo la membrana depolarizzata.
2. Permettere alla muscolatura di rilassarsi prima del battito successivo.

Tabella I-1. Velocità di conduzione nei diversi tessuti cardiaci (Bers, 1993)

	Nodo SA	Atrio	Nodo AV	Purkinje	Ventricolo
Potenziale diastolico (mV)	-50 ÷ -60	-80	-50 ÷ -60	-50 ÷ -60, se pacemaker; -80	-80
Tipologia di corrente di depolarizzazione	Ca	Na	Ca	Na	Na
Depolarizzazione Veloce	No	si	No	si	si
Velocità di conduzione (m/s)	0.1 ÷ 1	0.1 ÷ 1	0.001 ÷ 0.005	2 ÷ 4	0.3 ÷ 1

Le cellule del Purkinje

La necessità di mantenere un flusso emodinamico costante, con l'alto costo energetico che ne deriva, ha portato allo sviluppo di un sistema di conduzione cardiaco ottimizzato, con un sistema di attivazione sincronizzato, in grado di garantire la massima efficienza dell'attività cardiaca.

Come si è già detto, esso è costituito dal nodo SA, dall'asse di conduzione atrioventricolare (comprendente il nodo AV) ed infine dal complesso network chiamato "Sistema His-Purkinje" (HPS) formato dal fascio di His, delle branche di Tawara e dalle cellule del Purkinje (Dobrzynski et al., 2013; Vigmond & Stuyvers, 2015).

L'attuale classificazione degli HPS mammiferi è basata per lo più sulla struttura delle fibre di Purkinje e prevede tre diverse categorie, in base alle specie biologica: 1) ungulati, 2) umani, scimmie, gatti e cani e 3) topi, ratti e conigli. Laddove vi siano dati sperimentali disponibili, in questa Introduzione si farà riferimento a cellule di Purkinje umane o, al più, appartenenti alla seconda categoria.

Caratteristiche Biologiche e anatomiche

Le cellule del Purkinje, P-cells, prendono il nome da Johannes Purkinje, un anatomista, neurofisiologo e biologo ceco, che nel 19° secolo le descrisse dettagliatamente per la prima volta (Jay, 1999).

Anatomicamente le P-cells sono raccolte in fibre, connesse lateralmente e longitudinalmente l'una all'altra attraverso giunzioni denominate *Gap Junctions*. Le fibre del Purkinje si diramano in una complessa struttura tridimensionale, attraverso una combinazione di fibre sub-endocardiche. È stato inoltre osservato in alcune specie animali (coniglio, cane e maiale) che l'HPS è elettricamente connesso al muscolo ventricolare tramite delle cellule di transizione o delle particolari giunzioni Purkinje-Miocardio (Sebastian *et al.*, 2013)

Come i cardiomiociti ventricolari (VMs) esse mostrano un corposo reticolo endoplasmatico, evidenziato dalla massiccia presenza di recettori della rianodina nello spazio intracellulare. Tuttavia, rispetto alla controparte ventricolare, le P-cells sono prive dei T-tubuli, profondi avvallamenti della membrana cellulare, possiedono una diversa tipologia di mitocondri e una maggiore densità di glicogeno rispetto alle VMs.

Generalmente le P-cell sono più voluminose delle VMs, sebbene queste differenze varino da specie a specie (Ono *et al.*, 2009).

La principale funzione delle fibre del Purkinje è condurre rapidamente l'impulso elettrico nei ventricoli e assicurarne la corretta contrazione. Alla base della maggiore velocità di conduzione delle P-cells (tabella 3), vi sono l'espressione di una diversa tipologia di connessina, una glicoproteina di membrana, e l'alta velocità di depolarizzazione del PA. A differenza dei nodi SA e AV che presentano una preponderanza di piccole conduttanze (connessina Cx45), il HPS mostra delle conduttanza medie e grandi, formate dalle connessine Cx40 e Cx43 (Dobrzynski *et al.*, 2013; Dun & Boyden, 2008a; Gaborit *et al.*, 2007).

Le cause della maggiore velocità di depolarizzazione del PA delle P-cells saranno illustrate nel prossimo paragrafo.

Infine, le P-cells costituiscono il terzo pacemaker del cuore (con una frequenza intrinseca di 30-35 battiti/minuto), essendo capaci di depolarizzarsi autonomamente. Tuttavia, in condizioni fisiologiche, esse non mostrano alcuna capacità auto-ritmica e si comportano come una normale cellula eccitabile. Questo fenomeno, chiamato ***overdrive suppression***, è dovuto all'imposizione dell'eccitazione, a più alta frequenza, proveniente dal nodo SA (Boyden *et al.*, 2010; Stewart *et al.*, 2009).

Caratteristiche Elettrofisiologiche

In riferimento alla Figura I.3, si osservano nel PA quattro fasi distinte, comuni in PA di molte tipologie di cellule eccitabili.

Fase 0: rappresenta la fase di rapida depolarizzazione della membrana cellulare. In risposta ad una stimolazione elettrica sufficiente al raggiungimento della soglia, i canali del Na^+ permettono il passaggio di una corrente entrante, che rapidamente innalza il potenziale di membrana fino a valori positivi, variabili tra i 10 e i 35 mV (Dobrzynski *et al.*, 2013; Nagy *et al.*, 2015; Vigmond & Stuyvers, 2015). Il passaggio degli Ioni Na^+ è permesso dell'apertura dei gate-voltaggio dipendenti e dalla lenta attivazione dei gate di inattivazione, anch'essi voltaggio dipendenti. Sperimentalmente è verificata la presenza nelle cellule di Purkinje di due tipologie di canali del Na^+ , cui corrispondono due correnti differenti: la *corrente di sodio-veloce*, I_{Na} , e la *corrente di sodio-ritardata*, I_{NaL} , di intensità molto minore rispetto alla prima, ma dall'inattivazione più lenta, da cui il nome. La maggiore espressione dei canali relativi a queste correnti è una delle cause della più alta velocità di conduzione delle P-cells e della maggiore ampiezza del PA (Nagy *et al.*, 2015; Sampson *et al.*, 2010; Vigmond & Stuyvers, 2015).

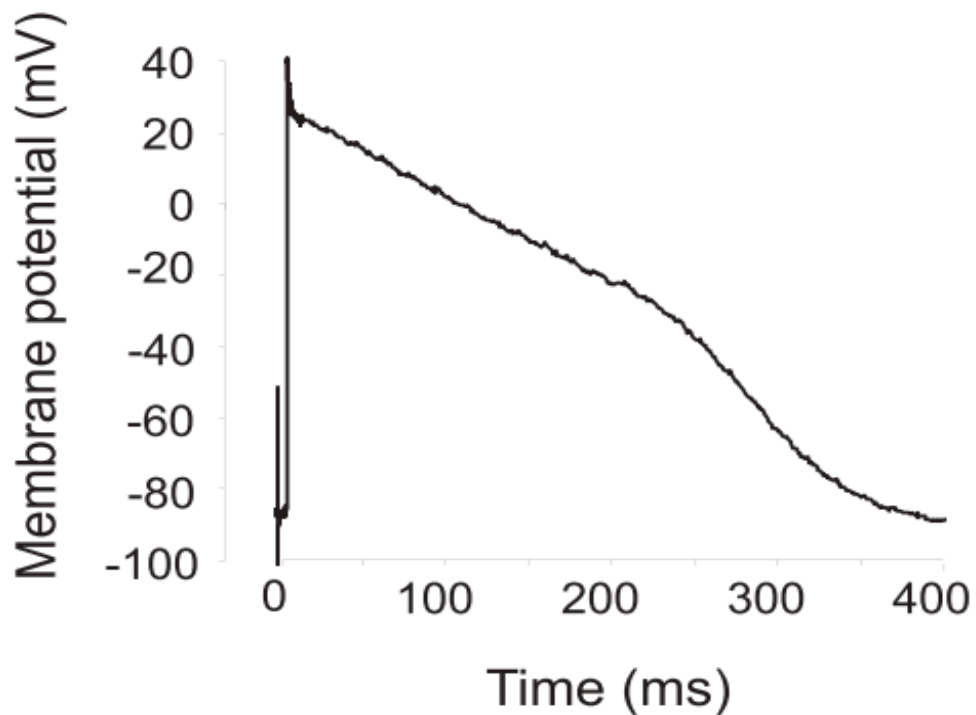


Figura I-3. Andamento di PA di Purkinje umano, modificata da Nagy et al., 2015

Fase 1: è la fase che intercorre tra il picco del Potenziale di membrana e l'inizio del Plateau. La depolarizzazione della cellula comporta una modifica dei gate della membrana. I Canali del Na^+ , pur aperti, si inattivano (inattivazione-voltaggio dipendente) mentre si aprono due particolari tipi di canali del K^+ , che permettono l'uscita di alcuni ioni potassio per gradiente di concentrazione. Si ottengono pertanto due correnti nette uscenti, I_{t0} (dall'attivazione e inattivazione voltaggio-dipendenti rapide) e I_{SUS} (dalla rapida attivazione voltaggio-dipendente), che permettono una piccola ripolarizzazione della membrana. Sperimentalmente, cellule umane di Purkinje, mostrano in Voltage Clamp una più debole I_{t0} ed una più forte I_{SUS} , rispetto alle controparti ventricolari (Han *et al.*, 2002), sebbene Gaborit (Gaborit *et al.*, 2007) abbia rilevato, nei suoi studi sull'espressione genica delle proteine canale, un aumento del trascritto relativo alla conduttanza di I_{t0} . Un aumento dell' I_{t0} è responsabile della morfologia di tipo "spike and dome", molto comune nel PA delle P-cells e di un valore di plateau più negativo rispetto alle VMs.

Fase 2: Plateau. La presenza della fase di plateau è dovuta alle correnti entranti I_{NaL} (che non si inattiva del tutto) e del Ca^{2+} , la cui attivazione, era iniziata già nella fase zero. Nelle P-cells sono stati rilevati due tipologie principali di correnti del Ca^{2+} : I_{CaL} , che presenta dei gate voltaggio-dipendenti e Ca^{2+} -dipendenti, e I_{CaT} , assente nei cardiomiociti ventricolari, di cui si hanno dati sperimentali soltanto in modelli animali (Nagy et al., 2015). La corrente I_{CaL} sembra essere minore nelle P-cells rispetto a quella rilevata nei ventricoli (Dobrzynski et al., 2013; Nagy et al., 2015; Vigmond & Stuyvers, 2015).

Il plateau del PA è funzionalmente importante per due ragioni:

1. mantenendo depolarizzata la membrana, la cellula resta in un periodo di refrattarietà assoluta, durante il quale non può essere nuovamente eccitata poiché i canali del sodio sono inattivati;

2. Il Ca^{2+} entrato attraverso i canali (L) della membrana plasmatica, origina un meccanismo di rilascio a cascata di calcio all'interno della cellula, chiamato ***Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR)***, da parte del reticolo sarcoplasmatico. A causa della mancanza dei T-tubuli, le cellule dei Purkinje presentano due tipi di reticolo sarcoplasmatico (SR): giunzionale (JSR), a ridosso della membrana cellulare, e corbulare (CSR), più interno (Boyden et al., 2010; Britton et al., 2013; Li & Rudy, 2011). La mancanza dei T-tubuli è una delle principali differenze tra P-cells e VMs, perché causa un gradiente di concentrazione di Ca^{2+} tra l'area prossima alla superficie interna della membrana (ove sono presenti i canali Ca^{2+} di tipo L e il JSR) e il centro della cellula. Infatti il Ca^{2+} entrato si lega ai recettori della rianodina del JSR permettendo un immediato rilascio di Ca^{2+} nello spazio intracellulare. A sua volta il Ca^{2+} rilasciato dal JSR, si propaga verso l'interno della cellula tramite il CICR, fino a raggiungere le regioni più interne della cellula e attivare i recettori presenti sul CSR, causando un ulteriore rilascio di Ca^{2+} . Questo secondo rilascio di Ca^{2+} ritardato, dovuto alla diffusione, potrebbe essere alla base di meccanismi pro-aritmici che si possono verificare nelle PA di cellule dei Purkinje ad esempio in condizioni

patologiche, ovvero le *Delayed after-depolarization (DADs)*, oggetto del prossimo paragrafo.

In condizioni fisiologiche, invece, l'aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} favorisce la formazione di ponti tra i miofilamenti innescando la contrazione cardiaca, che termina quando il calcio viene riassorbito dall'SR ed espulso fuori dalla cellula attraverso specifici trasportatori, quali lo scambiatore sodio-calcio;

Fase 3: è la fase di ripolarizzazione della membrana, determinata da due correnti uscenti di K^+ , una veloce, I_{Kr} , e l'altra più lenta, I_{Ks} , entrambe chiamate *rettificanti ritardate*. Non esistono dati relativi a queste due correnti provenienti da cellule del Purkinje umane. Studi su modelli sperimentali animali, canini (Nagy et al., 2015) e di coniglio (Aslanidi et al., 2010; Dobrzynski et al., 2013), mostrano una riduzione dell'espressione di I_{Kr} e I_{Ks} . D'altro canto, ancora Gaborit (Gaborit et al., 2007) non ha rilevato ampie variazioni tra le espressioni genetiche delle conduttanze di I_{Kr} e I_{Ks} in VMs e P-cells.

Fase 4: il potenziale di membrana ritorna al suo valore di riposo di -90 mV a seguito di un'importante flusso entrante di K^+ , la corrente I_{K1} , definita *rettificante entrante*. Dati di cellule umane di Purkinje (Gaborit et al., 2007; Han et al., 2002; Vigmond & Stuyvers, 2015) mostrano una riduzione di I_{K1} , rispetto ai VMs.

I_{K1} è la principale responsabile del potenziale di riposo della cellula, ma non è l'unica. La pompa Na/K, infatti, tramite il trasporto di 3 ioni Na^+ all'esterno della cellula e 2 ioni K^+ all'interno, genera un flusso netto di carica uscente.

Lo scambiatore Na-Ca, invece, è responsabile di un trasporto bidirezionale che scambia uno ione Ca^{2+} con 3 ioni Na^+ (e quindi di una corrente netta entrante) e, insieme alla Ca^{2+} -ATPasi del sarcolemma, bilancia il calcio intracellulare e quindi contribuisce al mantenimento del potenziale di riposo.

Le cellule del Purkinje, infine, presentano una peculiarità rispetto a tutti gli altri cardiomiociti, dovuta alla doppia natura di cellula eccitabile e, in caso di un blocco della conduzione, pacemaker. Esse infatti mostrano un doppio potenziale di riposo

(Boyden et al., 2010; Dobrzynski et al., 2013; Dun *et al.*, 2008b; Vigmond & Stuyvers, 2015): le P-cells, ad un potenziale diastolico meno negativo, mostrano attività pacemaker, ma ben polarizzate (-85 mV) rimangono quiescenti.

L'autodepolarizzazione delle P-cells è dovuta alla presenza di una particolare corrente, dovuta sia al flusso di ioni K sia di ioni Na: la *hyperpolarization-activated current* o *I funny*, I_f , che depolarizza lentamente la membrana e, in assenza di altra stimolazione, può portare al raggiungimento della soglia di potenziale necessaria per generare un PA spontaneo.

Meccanismi pro-aritmici nelle P-cells

Sempre più evidenze scientifiche suggeriscono che molte aritmie ventricolari siano innescate dalle P-cells (Boyden et al., 2010; Iyer et al., 2015; Maruyama et al., 2010; Sampson et al., 2010).

Alla base di queste aritmie ci possono essere delle alterazioni dell'andamento del PA ovvero del bilancio delle correnti sottostanti. Due tipi di alterazioni molto diffuse sono le After Depolarization, ovvero depolarizzazioni della membrana cellulare che avvengono durante la discesa del potenziale verso la fase di riposo (Early After-Depolarizations, EADs) o durante la fase di riposo stessa (le già citate DADs).

Le prime, di cui si riportano diversi andamenti in figura I.4 per cellule ventricolari, sono dovute ad una riattivazione della corrente di Ca^{2+} e/o della I_{NaL} , che interrompono la ripolarizzazione della cellula.

Le DADs sono, invece, delle oscillazioni del potenziale di membrana, dopo il completo esaurimento della dinamica del PA, che se sufficientemente ampie possono portare alla generazione di un nuovo PA e quindi un extra-battito.

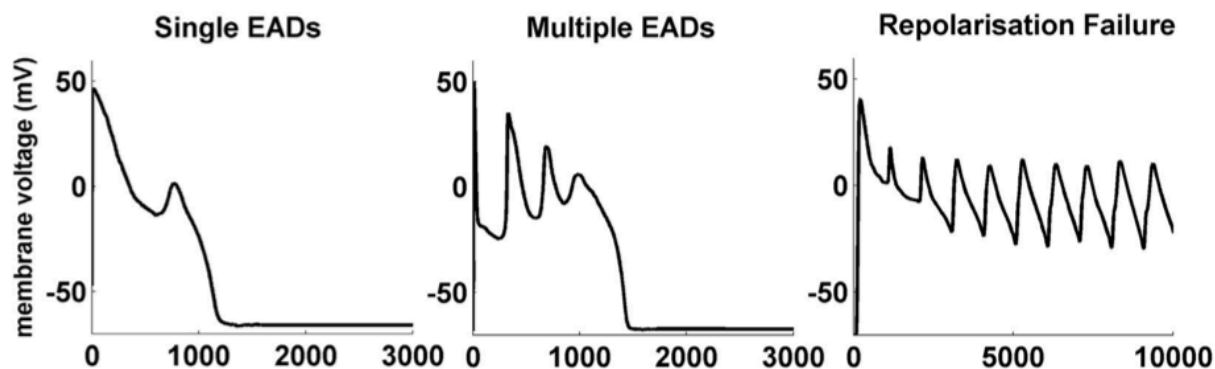


Figura I-4. Diversi tipologie di EADs, modificata da (Passini et al., 2015)

All'origine delle DADs vi è probabilmente un aumento dell'attività dello scambiatore Na/Ca, dovuto ad un'eccessiva concentrazione di Ca^{2+} intracellulare diastolico. Infatti in presenza di molti ioni Ca^{2+} (a seguito, per esempio, di un rilascio spontaneo del reticolo sarcoplasmatico), la pompa lavora introducendo, per ogni ione Ca^{2+} espulso, 3 ioni Na^+ , producendo una corrente netta entrante che depolarizza la cellula (Boyden et al., 2010). Un'alta concentrazione di calcio intracellulare diastolico, comporta, dunque, un aumento della corrente netta entrante di Na^{2+} e quindi una depolarizzazione del Potenziale di membrana, a valle della dinamica del PA.

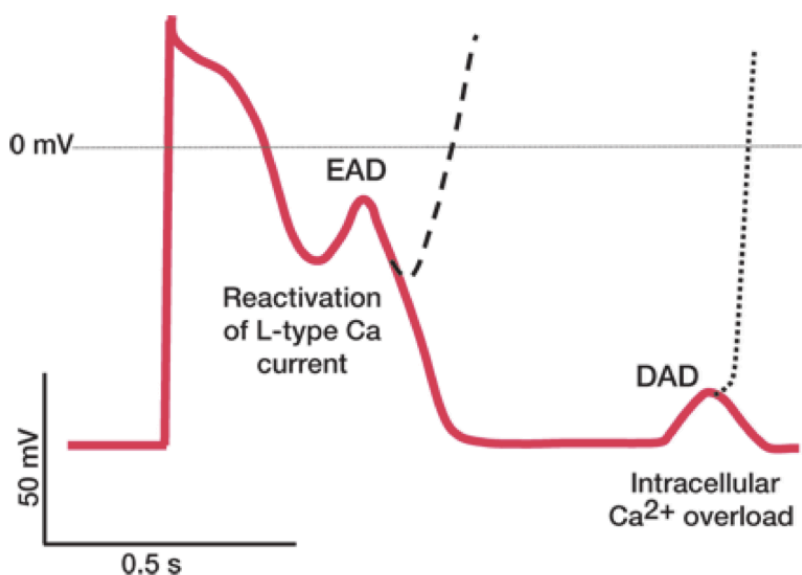


Figura I.5. Anomalie del PA, da Fauci AS et al.

Modellistica del Potenziale di membrana

Dal punto di vista fisico e biologico, il potenziale d'azione rappresenta una rapida depolarizzazione del potenziale di membrana di una tipologia di cellule che, proprio a seguito della capacità di cambiare il proprio stato di polarizzazione in risposta ad una stimolazione elettrica sufficientemente ampia, sono definite **eccitabili**. Le cellule non-eccitabili, invece, stimulate da un impulso di corrente, mantengono stabile il proprio potenziale di membrana, tornando rapidamente all'equilibrio non appena la stimolazione è rimossa.

Il **potenziale di membrana** è la differenza di potenziale elettrico generato dalla presenza di un gradiente elettro-chimico tra gli elettroliti interni alla cellula e quelli presenti nel liquido extracellulare, ovvero ai capi della membrana cellulare, che funge da dielettrico a causa del doppio strato fosfolipidico che la compone.

Il gradiente di concentrazione è generato dalla presenza di una differenza di concentrazione di ioni attraverso la membrana cellulare, essendo questa una membrana semipermeabile (il trasporto di acqua e ioni è permesso tramite i canali ionici presenti sulla e attraverso la membrana cellulare) tra due compartimenti. I principali ioni coinvolti sono Na^+ , K^+ e Ca^{2+} .

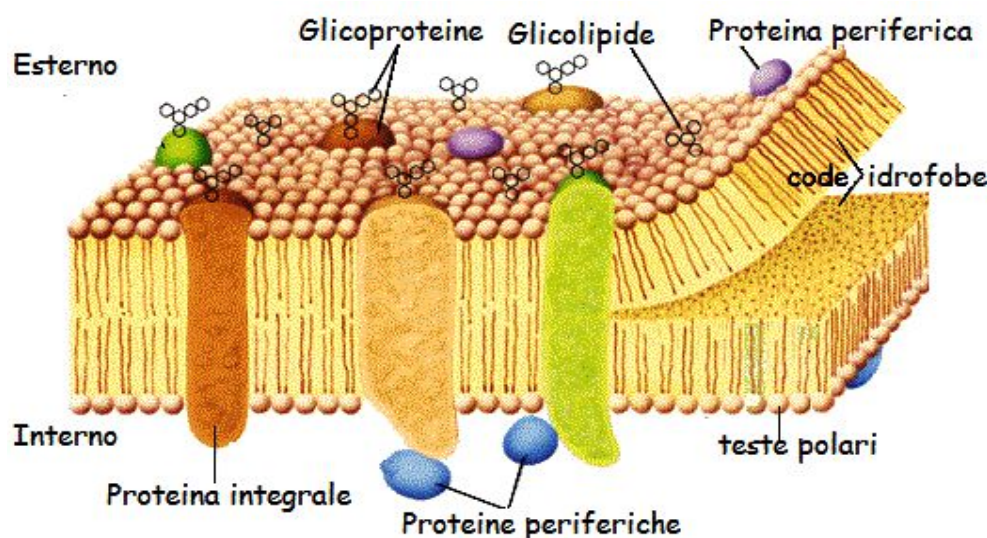


Figura I-6.
membrana
cellulare, costituita
dal doppio strato
fosfolipidico
isolante,
glicoproteine,
glicolipidi e
proteine di
membrana, da
Silverthorn, 2010

Il gradiente di concentrazione determina, pertanto, un flusso diffusivo per unità di superficie (mEq/s) dello specifico ione s *attraverso la membrana*, modellabile con l'equazione:

$$\phi_{s,diff} = -D_s \cdot \nabla c_s \quad (1.1)$$

con D_s coefficiente di diffusione della membrana.

La presenza di masse di ioni concentrate in un mezzo conduttore, come i fluidi intra ed extra cellulari, da origine ad un campo elettrico e quindi ad un gradiente di potenziale, la cui intensità sarà proporzionale alla differenza di concentrazioni e alla valenza degli ioni, secondo l'equazione, per le cariche positive:

$$\phi_{s,E} = \mu_s Z_s c_s E = -\mu_s Z_s c_s \cdot \nabla V \quad (1.2)$$

dove μ_s , Z_s e c_s rappresentano rispettivamente la mobilità elettroforetica, la valenza e la concentrazione della specie ionica ed E il campo elettrico generato.

La somma di questi due flussi ionici, costituisce il **flusso netto attraverso la membrana**:

$$\phi_{s,tot} = \phi_{s,diff} + \phi_{s,E} = -D_s \cdot \nabla c_s - \mu_s Z_s c_s \cdot \nabla V \quad (1.3)$$

Il potenziale di membrana per il quale i due flussi ionici si compensano, annullando il flusso netto, è chiamato **Potenziale di Nernst all'equilibrio** ed è rappresentato dall'equazione di Nernst. Fissate le concentrazioni intra ed extracellulari dello ione ed assumendo $\mu_s = \frac{FD_s}{RT}$.

$$V_i - V_e = \frac{RT}{FZ} \ln \frac{c_e}{c_i} \quad (1.4)$$

con R , costante dei gas perfetti, T , temperatura assoluta, F , Faraday (rappresentante la carica trasportata da una mole di elettroni) e Z , numero di valenza dello ione.

Moltiplicando il flusso ionico complessivo attraverso la membrana per il numero di cariche trasportate da ogni mole, si ottiene la corrente ionica di membrana. Assumendo che il flusso ionico e il campo Elettrico siano ortogonali alla superficie della membrana, possiamo considerare le variazioni di concentrazioni solo lungo la coordinata x , assunta ortogonale alla membrana:

$$I_s = \phi_{s,tot} \cdot FZ_s = -D_s FZ_s \frac{dc_s}{dx} - \frac{F^2 D_s Z_s^2}{RT} \frac{dV}{dx} \quad (1.5)$$

Integriamo tra interno ed esterno, assumendo I_s costante lungo lo spessore della membrana e, definendo *resistenza di membrana per unità di superficie* la quantità:

$$r_s = \frac{RT}{F^2 D_s Z_s^2} \int_i^e \frac{1}{c_s} dx \quad (1.6)$$

il cui reciproco g_s rappresenta una conduttanza per unità di superficie. Otteniamo, dunque, l'espressione della differenza di potenziale di membrana:

$$V = V_i - V_e = r_s I_s + \frac{RT}{FZ_s} \ln \frac{c_e}{c_i} = r_s I_s + E_s \quad (1.7)$$

ovvero

$$I_s = g_s (V - E_s) \quad (1.8)$$

con E_s potenziale di Nernst della specie ionica s. In figura I-7

è rappresentato l'analogo elettrico di un generico canale

ionico di membrana, mentre in tabella I-2 sono riportati i potenziali di Nerst (E_s) delle principali specie ioniche coinvolte nella genesi del Potenziale di membrana.

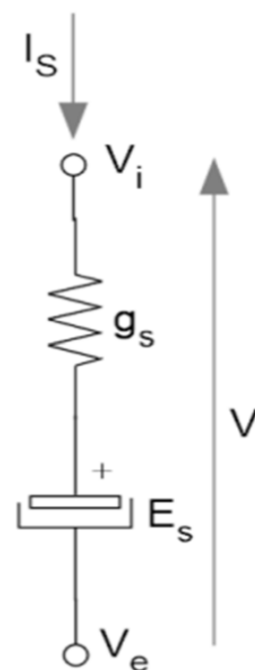


Figura I-7. Analogo elettrico di un canale ionico

Tabella I-2. Potenziali di Nerst delle principali specie ioniche, (Bers, 1993).

Specie ionica	Potenziale di Nernst (mV)
K	-90
Na	70
Ca	125
Cl	-55

Supponendo adesso di porre in parallelo gli analoghi elettrici dei canali ionici del Sodio, Cloro e Potassio, più un ulteriore canale che rappresenta ulteriori correnti di cui non si conoscono i dettagli, otteniamo una rappresentazione circuitale della membrana cellulare, come in figura

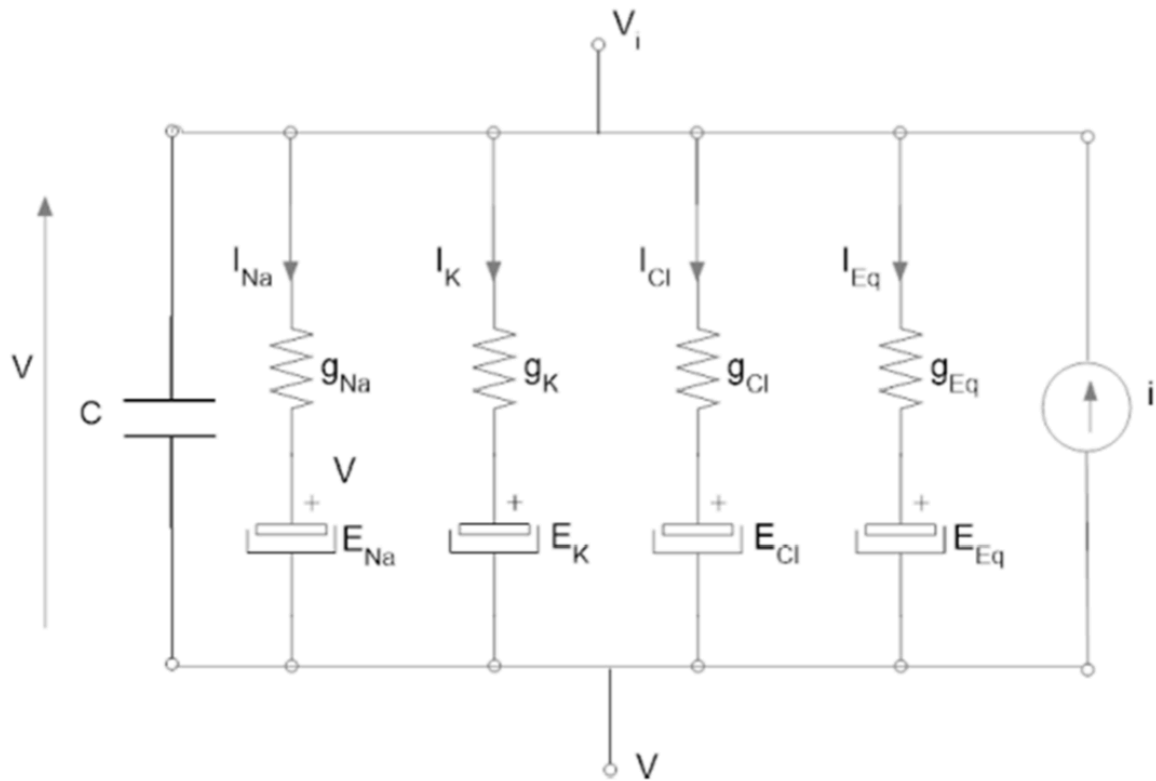


Figura I-8. Analogo elettrico della membrana cellulare, in cui sono evidenziate le correnti di sodio, potassio e cloro.

All'analogo elettrico in figura corrisponde la seguente equazione di bilancio delle correnti:

$$C \frac{dV}{dt} + g_{Na}(V - E_{Na}) + g_K(V - E_K) + g_{Cl}(V - E_{Cl}) + g_{eq}(V - E_{eq}) = i \quad (I.9)$$

Infine, supponendo nulla sia la corrente esterna i sia la derivata del potenziale, otteniamo l'espressione del **Potenziale di membrana a riposo**

$$V = \frac{g_{Na}E_{Na} + g_K E_K + g_{Cl} E_{Cl} + g_{eq} E_{eq}}{g_{Na} + g_K + g_{Cl} + g_{eq}} \quad (I.10)$$

da cui si evince che il potenziale di riposo della cellula, tenderà al potenziale di Nernst della specie ionica con le conduttanza più alta. Quest'ultima è, in condizioni di riposo della cellula, quella dello ione K^+ ed, infatti, il potenziale di riposo di una generica cellula si attesta intorno ai $-70 \div -90$ mV.

La modellazione matematica delle conduttanze di canale si basa sugli studi elettrofisiologici condotti sulle proteine di canale presenti nella membrana cellulare, tramite esperimenti in Voltage Clamp, una tecnica elettrofisiologica che permette la

rilevazione delle correnti di canale nell'ordine dei pico-Ampere, di cui si dirà di più in seguito.

Ogni ione a cui la membrana è permeabile, dispone infatti di particolari complessi proteici (proteine di canale), altamente selettivi, che sono situati attraverso la membrana e dispongono di sistemi di apertura e chiusura in funzione del potenziale di membrana (canali voltaggio dipendenti), della concentrazione di una specifica specie ionica (es. canali calcio-dipendenti) o di variazioni conformazionali dei condotti proteici (a seguito, per esempio, della fosforilazione del canale). In genere ciascun canale si può trovare in uno dei quattro stati indicati in Tabella I-3.

Tabella I-3. Possibili configurazioni dello stato di un canale ionico

Aperto-Attivo	Aperto-Inattivo
Chiuso-Attivo	Chiuso-Inattivo

La conduzione è possibile solo in un canale in stato aperto e attivo. Inoltre la corrente che attraversa la membrana è proporzionale anche al numero di canali per unità di area presenti nel doppio strato fosfolipidico. Pertanto le conduttanze di canale possono essere modellate* tramite il prodotto tra una conduttanza massima di canale per unità di area $g_{s,max}$ e una o più variabili non lineari e tempo-varianti che riproducono le dinamiche di apertura, chiusura, attivazione e inattivazione dei canali ionici, tramite equazioni algebriche o differenziali (nel seguente esempio x, y e z):

$$g_s = g_{s,max} \cdot x \cdot y \cdot z \quad (I.11)$$

La trattazione della modellazione matematica del potenziale d'azione di una cellula nei suddetti termini ha origine dal lavoro svolto da due fisiologi inglesi (Hodgkin & Huxley, 1952) sull'assone gigante del calamaro. Hodgkin e Huxley riuscirono a ricavare l'andamento delle conduttanze dei canali del sodio e del potassio, tramite un

* Metodi alternativi, derivanti dalla teoria probabilistica, fanno uso di modelli Markoviani: modelli per la riproduzione di eventi stocastici. per cui lo stato futuro di una variabile, dipende solo ed esclusivamente dallo stato corrente della stessa (Fine *et al*, 1998).

esperimento definito “Blocco di voltaggio” (**Voltage Clamp**), e utilizzando un set di elettrodi, come illustrato in figura I.9.

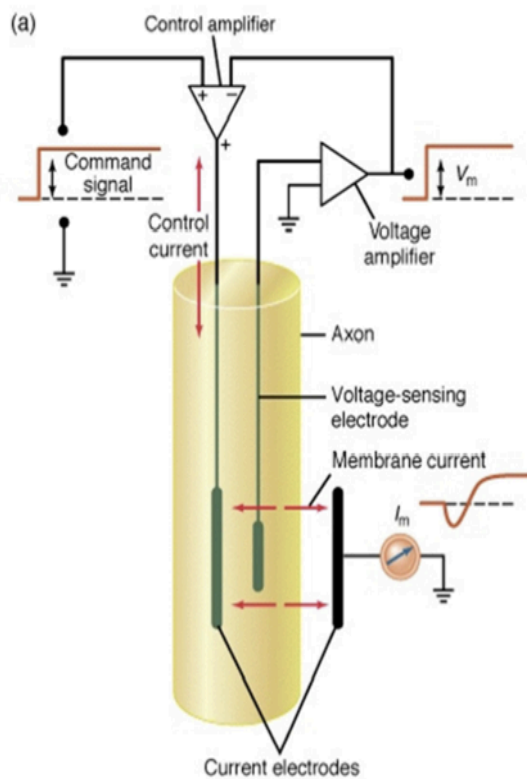


Figura I.9 Esempio di set-up di un Voltage Clamp

In un bagno elettrolitico a concentrazioni controllate e definite, un elettrodo collegato ad un voltmetro permette di rilevare la differenza di potenziale tra interno ed esterno dell'assone (utilizzando un elettrodo esterno di riferimento). Il potenziale di membrana V_m , così rilevato, è poi confrontato con un valore di riferimento ('Command signal'): ad ogni scostamento di V_m , un segnale elettrico, misurato tramite amperometro, viene iniettato nel sistema per riportare V_m al valore di riferimento. Attraverso questo sistema in retroazione, V_m è mantenuta

costante e la corrente iniettata coincide con la corrente che attraversa la membrana cellulare attraverso i canali ionici.

L'uso di elettrodi assiali, infine, permette di attenuare gli effetti di propagazione del potenziale, limitando la dipendenza delle grandezze dallo spazio. Noto il valore del potenziale e delle correnti, è possibile dunque determinare il valore della conduttanza della membrana. Ripetendo l'esperimento a diversi valori del potenziale di riferimento è possibile ricostruire l'andamento dei diversi gate in funzione del potenziale.

Ricavate le equazioni dei gate per il calcolo delle variabili della (I.11), Hodgkin e Huxley riuscirono sfruttando la (I.9) a determinare un modello matematico del potenziale d'azione del neurone.

Da allora sono trascorsi più di sessant'anni di modellistica di cellule eccitabili. Una decade dopo Hodgkin & Huxley, un fisiologo inglese, Denis Noble, pubblicò un modello matematico di PA di Purkinje mammifero. Il lavoro di Noble è stato fatto sulla base di quanto svolto dai suoi compatrioti nel '52 (Noble, 1962), ma adattato ad un tipo diverso di cellula e rappresenta quindi il primo modello di potenziale d'azione cardiaco. Una delle modifiche riguarda la scomposizione della corrente di K^+ in due componenti, I_{K1} e I_{K2} , con diverse dinamiche dei gate. Con la diffusione della tecnica del Voltage Clamp e la crescita dei dati sperimentali disponibili, McAllister *et al.* (1975) svilupparono un altro modello di PA di Purkinje, ma questa volta con nove correnti: in particolare, questo modello vede l'introduzione di una nuova corrente entrante di calcio, I_{Ca} , un transiente di cloro, I_{Cl} , e le correnti di K^+ lenta e veloce, I_{Kr} e I_{Ks} . Un ulteriore e importante miglioramento del grado di accuratezza dei modelli fu dato dal lavoro DiFrancesco & Noble (1985), che implementarono, in un nuovo modello di AP di Purkinje, anche le variazioni dinamiche delle concentrazioni intra ed extra cellulari, insieme alle pompe e agli scambiatori necessari al mantenimento del gradiente di concentrazione, e una descrizione del rilascio del Ca^{2+} da parte del reticolo sarcoplasmatico.

A seguire da questi modelli, la modellazione del PA cardiaco si è evoluta negli anni, e ha visto lo sviluppo di modelli per diversi tipi di cellule cardiache (atriali, ventricolari) e di un'ampia varietà di specie (cane, coniglio, topo, uomo). Tuttavia, la modellazione di PA di cellule cardiache del Purkinje subisce una battuta d'arresto decennale, interrotta solo dalla progettazione di un nuovo modello ad opera di Stewart *et al.*, (2009), di cui si parlerà nel dettaglio in seguito.

Ad oggi il gold-standard della modellazione matematica cardiaca è considerato il modello umano ventricolare di O'Hara *et al.* (2011), sviluppato a partire dai dati elettrofisiologici prodotti dal dipartimento di farmacologia dell'Università di Szeged, da più di 150 cuori umani. Anche di questo modello ORd si daranno maggiori informazioni in seguito, nel capitolo "*Materiali e Metodi*".

Modelli cardiaci di Purkinje: lo stato dell'arte

Come ricordato in precedenza, lo sviluppo di modelli matematici di cellule cardiache di Purkinje ha subito un arresto dopo la pubblicazione del modello di DiFrancesco-Noble nel 1985. Negli anni più recenti, sono stati sviluppati soltanto due modelli di potenziale d'azione di cellula cardiaca di Purkinje umana: il modello di Stewart (Stewart et al., 2009) e quello di Sampson (Sampson et al., 2010). Un ipotetico terzo modello di Purkinje è stato realizzato da ten Tusscher e Panfilov (K. H. W. J. T. Tusscher & Panfilov, 2008), modificando le conduttanze di due correnti del modello ventricolare realizzato dagli stessi nel 2006 (K. H. W. J. ten Tusscher & Panfilov, 2006).

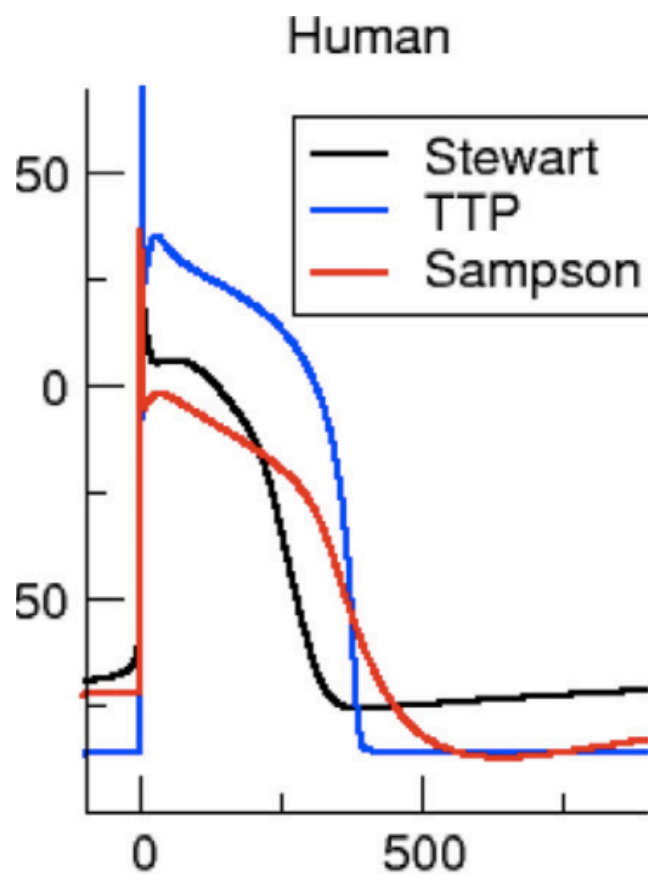


Figura I-10. Potenziale d'azione di modelli di Purkinje umano, modificata da (Vigmond & Stuyvers, 2015)

Il modello di Stewart

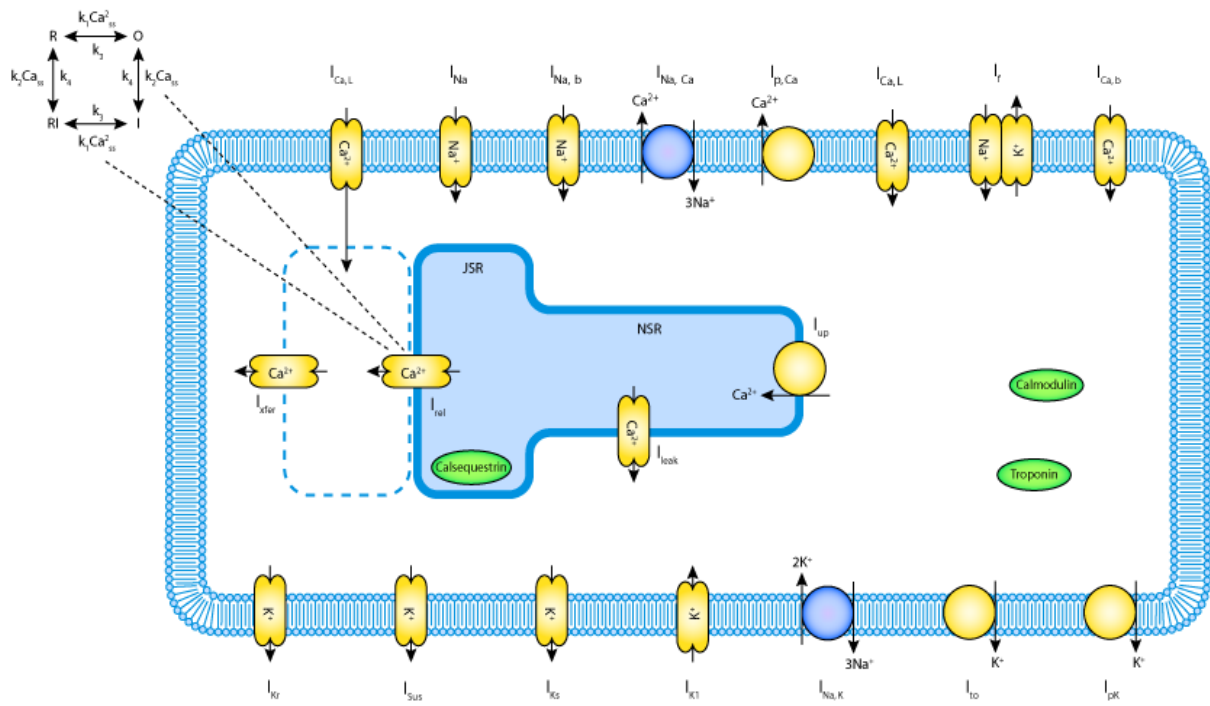


Figura I-11. Schema generale del modello di Stewart, da Stewart et al, 2009.

Il modello matematico di PA di cellula umana di Purkinje di Stewart è sviluppato sulla base dei modelli ventricolari di ten Tusscher (ten Tusscher *et al*, 2004; ten Tusscher & Panfilov, 2006), a cui si farà riferimento con la sigla TT04 e TT06. Il PA è rappresentato dall'equazione, ormai nota:

$$C_m \frac{dV}{dt} = -(I_{\text{ion}} + I_{\text{stim}}) \quad (\text{I.12})$$

con I_{ion} data dall'equazione di bilancio delle correnti:

$$I_{\text{ion}} = I_{\text{Na}} + I_{\text{to}} + I_{\text{sus}} + I_{\text{Ca,L}} + I_{\text{Kr}} + I_{\text{Ks}} + I_{\text{f}} + I_{\text{K1}} + I_{\text{NaCa}} + I_{\text{NaK}} + I_{\text{b,Na}} + I_{\text{b,Ca}} + I_{\text{p,K}} + I_{\text{p,Ca}} + I_{\text{Stim}} \quad (\text{I.13})$$

Il modello conta complessivamente 26 variabili di stato e 54 parametri. I gate di tutte le correnti ioniche sono modellati secondo il formalismo della (11), introdotto da Hodgkin & Huxley. Rispetto al modello TT04 sono state introdotte due correnti aggiuntive: I_{sus} , corrente di K^+ modellata con una variabile di attivazione istantanea sui dati di Han (Han et al., 2002) e I_f , la cui formulazione è stata ispirata a quella del

modello di cellula seno-atriale di coniglio di Zhang (Zhang et al., 2000), e ancora basata sui dati di Han. Inoltre sono state modificate le conduttanze e la struttura delle correnti I_{K1} e I_{to} , sempre in base ai dati sperimentali di Han. Infine è stata aumentata notevolmente (+910%) la conduttanza della I_{Na} per aumentare la durata del PA, e ridotte le conduttanze di I_{Kr} e I_{Ks} , rispettivamente del 5% e del 40%, con un conseguente allungamento del PA.

Il sistema di gestione del calcio intracellulare di questo modello è stato ereditato integralmente dal modello ventricolare, così come la pompa Na/K e lo scambiatore Na/Ca. I_{NaL} e I_{CaT} sono assenti, Infine il modello, in assenza di stimolazione, mostra un'attività pacemaker spontanea, con un periodo di 1100 ms, ovvero di 0.91 Hz

Si riportano in tabella i valori di alcuni biomarker calcolati per il PA di questo modello, stimolato ad 1 Hz per 1000 battiti, per il raggiungimento dello stato stazionario (Steady State).

Massimo Potenziale	-75.5 mV
Diastolico	
Ampiezza del PA	123 mV
Velocità di	
depolarizzazione	327 mV/s
APD90	193 ms

Tabella I-4. Principali biomarker del PA del modello di Stewart.

Il modello è disponibile in *CellML*, uno dei linguaggi standard internazionali di programmazione per la modellazione di sistemi biologici a livello cellulare.

Il modello di Sampson

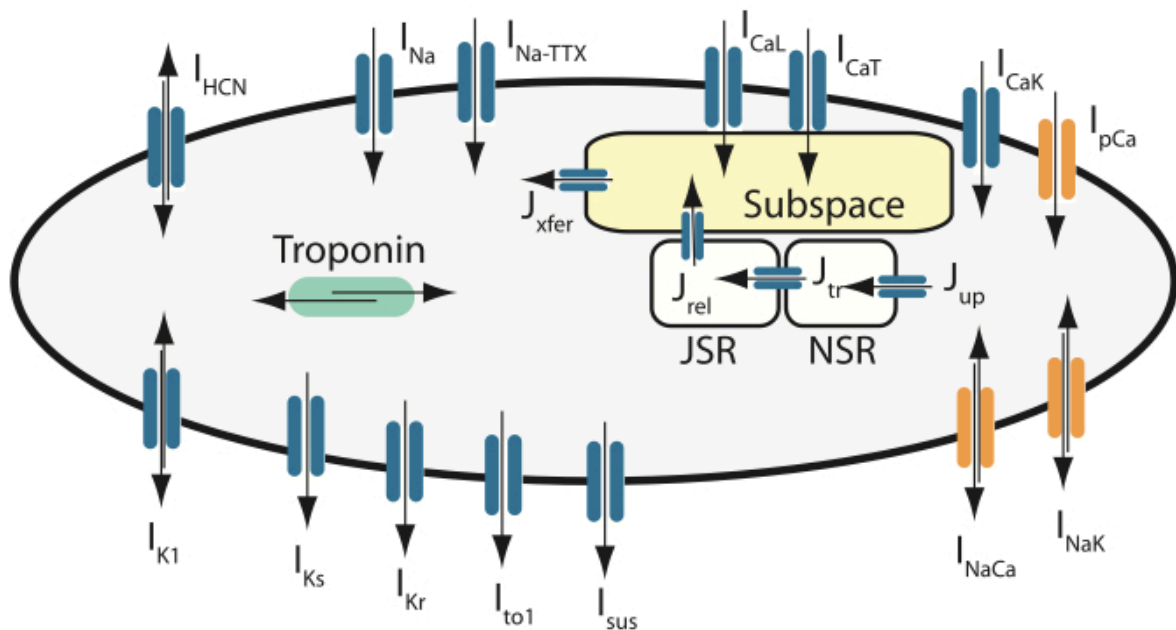


Figura I-12. Schema Generale del Modello di Sampson, da (Sampson et al., 2010).

Il modello di Sampson (Sampson et al., 2010) è profondamente differente dal modello di Stewart.

Infatti, sebbene questo modello contenga tutte le correnti del modello di Stewart, aggiungendo soltanto I_{NaL} e I_{CaT} , la loro formulazione è sostanzialmente diversa. Tutte le correnti di membrana, ad eccezione di I_{K1} , I_{Ks} , I_{CaT} e I_f , sono state modellate con una struttura di tipo Markoviano.

Come conseguenza, il modello Sampson possiede 96 parametri e 82 variabili di stato, che richiedono quindi la risoluzione di altrettante equazioni differenziali, e aumentano notevolmente il tempo di calcolo necessario per la loro risoluzione.

Inoltre, il sistema del rilascio del Ca^{2+} nel comparto intracellulare è modellato utilizzando tre compartimenti: due per il reticolo sarcoplasmatico *JSR* e *NSR*, da cui transita il flusso di uptake del Ca^{2+} , e uno, il *Subspace*, che raccoglie anche il flusso di Ca^{2+} di I_{CaL} e I_{CaT} e gestisce il release di Ca^{2+} .

I due modelli presentati mostrano alcune delle caratteristiche tipiche delle cellule del Purkinje. Tuttavia, nel caso del modello di STW, non è tenuta in considerazione l'evoluzione dei modelli di cardiomiociti ventricolari umani ed, in particolare, la pubblicazione del modello ORd, la cui validazione, caso unico nella storia dei modelli, è avvenuta rispetto ai dati provenienti da 150 cuori umani.

Nel caso del modello di Sampson, invece, l'utilizzo di modelli markoviani per la modellazione delle correnti ioniche, comporta un enorme sforzo computazionale, che appare non necessario.

Infine entrambi i modelli presentano dei modelli di compartimentazione cellulare e del reticolo sarcoplasmatico che non tengono in considerazione le peculiarità morfologiche delle cellule del Purkinje, dunque, i processi di diffusione intracellulare del Ca^{2+} , che potrebbero essere una delle cause del comportamento pro-aritmico di questa tipologia di cellule.

Materiali e Metodi

Dati di cellule umane di Purkinje

Dati Sperimentali

I dati sperimentali utilizzati in questo lavoro di tesi, solo parzialmente pubblicati (Nagy et al., 2015), provengono da campioni multicellulari di fibre bianche libere di Purkinje, connesse ai cardiomiociti asportati dal ventricolo destro di sette cuori umani sani, usati per l'asportazione delle valvole aortiche e polmonari per interventi di trapianto.

I PA sono stati registrati dal gruppo di ricerca *Cardiovascular Pharmacology* dell'Università di Szeged (Ungheria), a 37°, usando le tecniche convenzionali di elettrofisiologia. I campioni cellulari sono stati posti in un'apposita camera, in perfusione continua con la soluzione CO₂-satura Krebs-Henseleit (la cui composizione è riportata in tabella MM-1), mantenuti a pH 7.4, e stimolati con impulsi costanti di

corrente di durata di 1 ms alla frequenza di 1Hz, attraverso un paio di microelettrodi bipolari ad alta impedenza (più di 15 MΩ) in platino, usando un elettrostimolatore (Hugo Sachs Elektronik, model 215/II). In figura MM-1 è riportato lo schema di collegamento degli elettrodi.

Tabella MM-1. Composizione della soluzione Krebs-Henseleit

Krebs-Henseleit Composizione (mmol/L)
118.5 NaCl
4 KCl
1.2 NaH ₂ PO ₄
25 NaHCO ₃
1 MgSO ₄
11 glucose
1.8 CaCl ₂

I microelettrodi, riempiti con 3 mol/L di KCL, sono stati collegati ad un amplificatore (Biologic Amplifier, model VF102). Il voltaggio in uscita dall'amplificatore è stato campionato usando un convertitore A/D (NI 6025, Unisip Ltd).

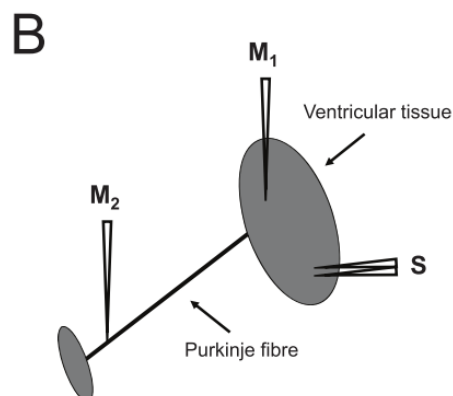


Figura MM-1. Diagramma schematico del sistema a due elettrodi. S: elettrodo di stimolazione; M1 microelettrodo per il sensing del PA del tessuto ventricolare; M2 microelettrodo per il sensing del PA di Purkinje, from (Nagy et al., 2015)

In totale sono stati forniti dati relativi a 17 campioni umani di Purkinje, (2-3 per cuore). Per ognuno di questi sono state registrate 10 tracce. Di una di queste è stata fornita l'intera registrazione di un potenziale d'azione rappresentativo (figura MM-2), mentre delle altre 9 sono stati forniti i valori dei biomarker elencati in tabella MM-2.

Biomarker	Descrizione
TOP	<i>Take off Potential</i> , potenziale rilevato prima della depolarizzazione.
EOP	<i>End of Potential</i> , potenziale rilevato, al termine del PA.
AMP	<i>Amplitude</i> , differenza tra il TOP e il picco massimo del Pm.
DVmax	<i>Maximum upstroke velocity</i> , massima velocità di depolarizzazione
APD90/75/50/25/10	<i>Action Potential Duration</i> , tempo che intercorre tra l'istante in cui la dV è massima e la ripolarizzazione della membrana al 90/75/50/25/10%.

Tabella MM-2. Elenco dei principali biomarker utilizzati.

Si riportano, in tabella MM-3, i dati relativi ai biomarker dell'intero dataset, che verranno utilizzati nella fase di costruzione del modello e di calibrazione della popolazione.

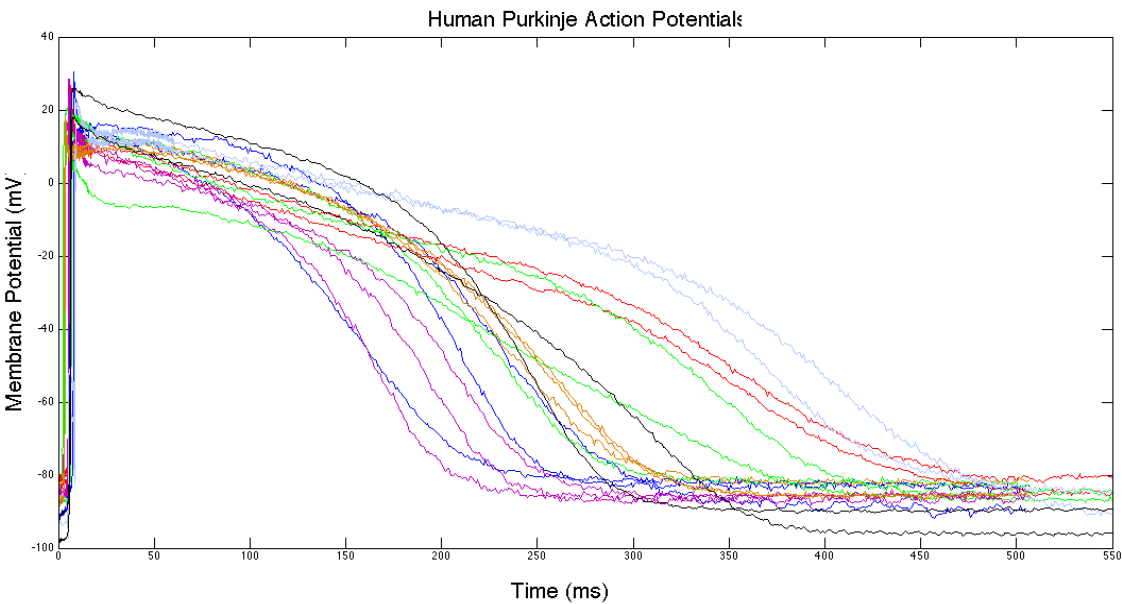


Figura MM-2. Registrazione di 18 Potenziali d'azione di cellule del Purkinje provenienti da 7 cuori umani (differenti per colori), forniti dall'Università di Szeged.

Tabella MM-3. Valori minimi, massimi, medi e mediani del dataset sperimentale fornito dall'Università di Szeged

EXP	TOP (mV)	EOP (mV)	AMP (mV)	dVmax (mV/s)	APD90 (ms)	APD75 (ms)	APD50 (ms)	APD25 (ms)	APD10 (ms)
Min	-90.2	-90.2	92	117.2	187.1	165.9	124	31.2	1.2
Max	-81.8	-81.8	116.92	688.5	438	385	351.8	185	147.6
Media	-85.8	-84.67	106.45	371.96	304.72	270.68	220.65	117.63	42.21
Mediana	-86	-85	106.2	319.82	284.7	253.75	216.2	139.7	26.6

Dati in Letteratura

Gli unici dati sperimentali quantitativi disponibili in letteratura, relativi a cellule umane di Purkinje, sono quelli pubblicati da Han nel 2002 (Han et al., 2002) e da Gaborit nel 2007 (Gaborit et al., 2007), sebbene questi ultimi si riferiscano ad espressioni geniche delle conduttanze di canale, e non alla registrazione diretta di correnti in patch clamp come negli studi di Han. Non essendo ancora del tutto compresa la relazione tra l'espressione del RNA di una proteina canale e la densità di corrente ionica relativa a quel canale, si farà riferimento ai soli dati pubblicati da Han.

Il modello sperimentale di Han è costituito da fibre libere di Purkinje, isolate dal miocardio del ventricolo sinistro di nove cuori umani infartuati. Le cellule isolate sono state poste in una soluzione adeguata per studi in patch clamp, commercializzata con il nome di *Standard Tyrode* e contenente (in mM) 136 NaCl, 5.4 KCl, 1.0 MgCl₂, 1.0 CaCl₂, 0.33 NaH₂PO₄, 5.0 HEPES e 10 destrosio.

Le cellule sono state poste, invece, in una soluzione, priva di sodio e calcio, contenente (in mM) 110 K⁺-aspartato, 20 KCl, 1 MgCl₂, 5 Mg₂ATP, 10 HEPES, 5 fosfo-creatina, 0.1 GTP e 5 EGTA, adatta per lo studio in patch-clamp dei canali del K⁺.

ione	Concentrazione <i>Standard Tyrode</i>	Concentrazione soluzione in pipetta
K^+	5.4	140
Na^+	136	≈ 0
Ca^{2+}	1	≈ 0

Tabella MM-4.
Concentrazioni
Standard Tyrode
(ambiente
extracellulare) e della
soluzione in pipetta
(ambiente
intracellulare) per
patch-clamp dei
canali ionici del
potassio

Il sistema, così costituito, ha permesso la registrazione della densità delle correnti I_{K1} , I_{to} , I_{sus} e I_f , di cellule del Purkinje e di cardiomiociti ventricolari.

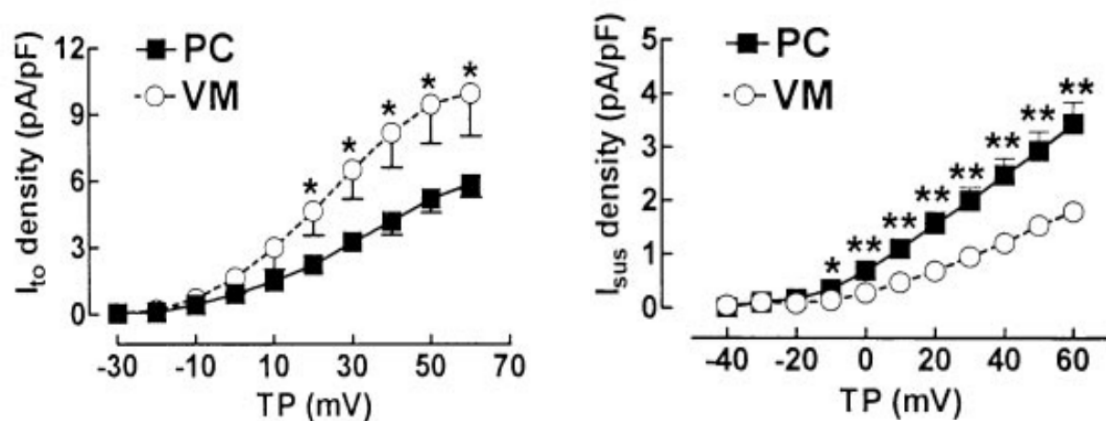


Figura MM-3. Curva I-V delle correnti: I_{to} (a sinistra) e I_{sus} (a destra), modificata da Han et al. 2002

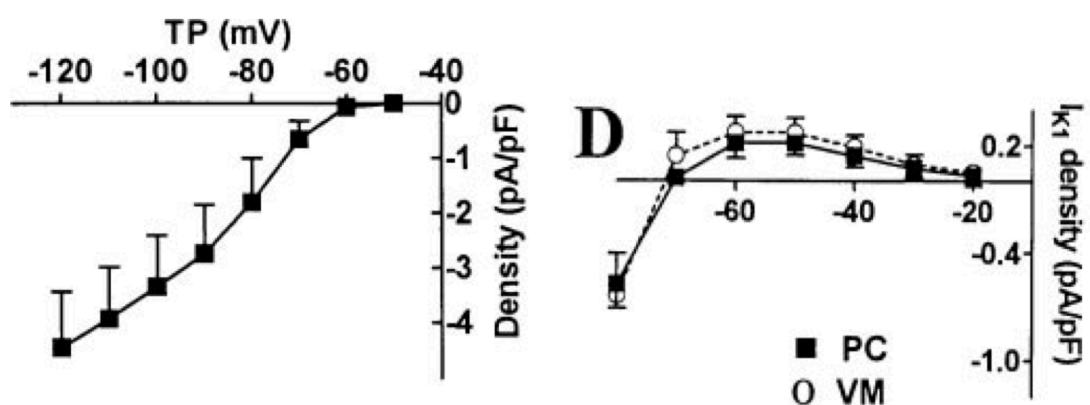


Figura MM-4. I-V curve delle correnti: I_{K1} (a destra) e I_f (a sinistra). Modificata da Han et al., 2002

Come si evidenzia dalla figure MM-3 e MM-4, le P-cell rispetto ai VMs mostrano una I_{sus} maggiore ed una diminuzione delle correnti I_{to} e I_{K1} . Si riporta anche, figura MM-5 (box a sinistra) la I-V curve della I_f , assente nei VMs.

Modello Computazionale

Il nuovo modello di cellula del Purkinje umana è stato costruito, analogamente ai modelli TT04&TT06 per il modello di Stewart, sulla base dell'attuale gold standard della modellazione cardiaca umana: il modello ventricolare di O'Hara e Rudy (O'Hara et al., 2011), da adesso in poi indicato con la sigla ORd, per l'endocardio, in figura MM-5.

Le caratteristiche elettrofisiologiche peculiari delle cellule del Purkinje sono state, dunque, integrate nel modello ventricolare, tramite l'introduzione *ex novo* di nuove correnti (I_{sus} , I_{CaT} , I_f) e la modifica della modellazione (I_{Na} , I_{CaL} , I_{to} , I_{K1}) e/o il ridimensionamento delle conduttanze di canale (I_{NaL} , I_{Kr}) delle correnti esistenti, sulla base dei dati sperimentali esistenti, quantitativi e qualitativi.

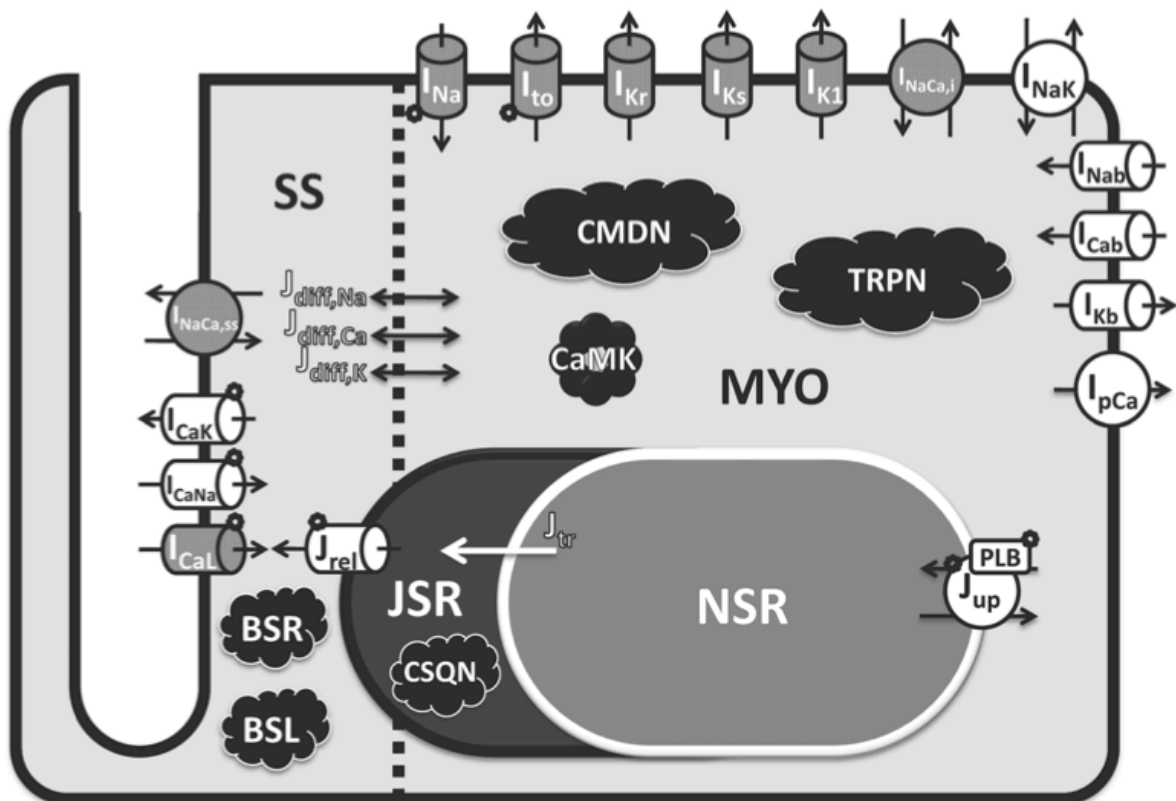


Figura MM-5. Schema generale del modello computazionale elaborato da O'Hara e Y. Rudy nel 2011.

Geometricamente la cellula è stata modellizzata come un cilindro di lunghezza L e raggio r , come in ORd. Tuttavia la diversa anatomia cellulare tra le P-cell e i VM, ha reso necessaria l'implementazione di una nuova compartimentazione dello spazio intracellulare, per tenere conto della presenza della formazione di un gradiente ionico intracellulare, dovuto alla mancanza dei T-tubuli. Lo spazio intracellulare della cellula, pertanto, è stato modellizzato diversamente rispetto ad ORd, sulla base del modello di cellula canina di Purkinje elaborato da Li e Rudy (Li & Rudy, 2011), analogamente al lavoro svolto da Britton et al (Britton et al., 2013).

La dinamica del potenziale di membrana è espressa tramite l'equazione differenziale:

$$C_m \frac{dV}{dt} = -(I_{ion} + I_{stim})$$

ove $C_m = 1.0 \mu F$ rappresenta la capacità della membrana cellulare, I_{stim} la corrente di stimolazione esterna e I_{ion} il bilancio complessivo delle correnti transmembrana:

$$I_{ion} = I_{Na} + I_{NaL} + I_{to} + I_{sus} + I_{CaL} + I_{CaT} + I_{CaNa} + I_{CaK} + I_{Kr} + I_{Ks} + I_f + I_{K1} + I_{NaCa} \\ + I_{NaK} + I_{Nab} + I_{Cab} + I_{Kb} + I_{pCa} + I_{stim}$$

Una dettagliata lista delle equazioni e dei parametri utilizzati per lo sviluppo del modello è disponibile nell'Appendice A.

Popolazione di modelli

L'approccio alla popolazione di modelli (POMs), recentemente sviluppato dal *Computational Cardiovascular Science Group* (Computer Science Department, University of Oxford, UK) e già applicato in differenti contesti (Britton et al., 2013;

Passini *et al.*, 2015; Muszkiewicz *et al.*, 2015; Walmsley *et al.*, 2013), è una nuova metodologia nella modellazione computazionale del PA cardiaco.

L'approccio alla modellazione attraverso le POMs, permette l'inclusione della variabilità presente nei dati sperimentali, normalmente ignorata dalle tecniche di modellazione classica, che descrivono il *comportamento medio* della cellula.

Ogni individuo può, infatti, avere una risposta differente ad una malattia o ad una terapia farmacologica e, dunque, tenere in considerazione la variabilità delle risposte, potrebbe essere la chiave per capire i meccanismi che generano queste differenze.

Invece di considerare un singolo modello medio di PA, sono simulati migliaia di modelli contemporaneamente, tutti generati da un unico modello di base (*baseline model*) variando, casualmente all'interno di un intorno definito (ad esempio [50-150]%, [0 200]%) del valore nominale, selezionati parametri del baseline model.

Generata la popolazione, segue la calibrazione, tramite il confronto con i dati sperimentali: calcolati i biomarker dei potenziali generati da ciascun modello appartenente alla POMs, solo i PA i cui biomarker sono in linea con i valori sperimentali, ovvero appartengono al range [min - max] definiti in tabella MM-3, vengono accettati e mantenuti nella popolazione. I restanti modelli di PA sono scartati, riducendo notevolmente la dimensione della popolazione calibrata rispetto a quella iniziale.

In questo modo, ogni modello rappresenta una cellula differente, ma della stessa tipologia, e le differenze tra le cellule permettono di tenere in conto sia la variabilità inter-soggetto sia quella intra-soggetto.

Nel presente lavoro, dal nuovo modello computazionale medio di cellula umana di Purkinje, è stata generata una popolazione di 3000 modelli, variando i valori nominali del modello nell'intervallo [50 - 150]%. L'intera popolazione è riportata in figura MM-6, mentre l'elenco dei parametri scelti è riportato in tabella MM-5.

Spazio dei Parametri Variati nel modello di base				
G_{Na}	G_{NaL}	pCa	G_{CaT}	G_{to}
G_{sus}	G_{Kr}	G_{Ks}	G_f	G_{K1}
G_{NCX}	PNaK	Jrel	Jup	

Tabella MM-5. Spazio dei parametri variati nel modello di base per la generazione della popolazione: tutte le G rappresentano le conduttanze di canale delle specifiche correnti; Jup è l'uptake di Ca^{2+} che rientra nel reticolo SR, mentre, Jrel è il rilascio di Ca^{2+} .

All'interno della popolazione così generata, alcuni modelli hanno mostrato la presenza di DADs e, pertanto, il successivo passaggio è stato la separazione tra le tracce che presentavano DADs e quelle che non ne mostravano, in base al valore delle derivate prima e seconda del potenziale di membrana. Infine, dai modelli che non mostravano DADs, sono stati calcolati i biomarker per procedere con la calibrazione e l'analisi della popolazione. I risultati sono presentati nel prossimo capitolo.

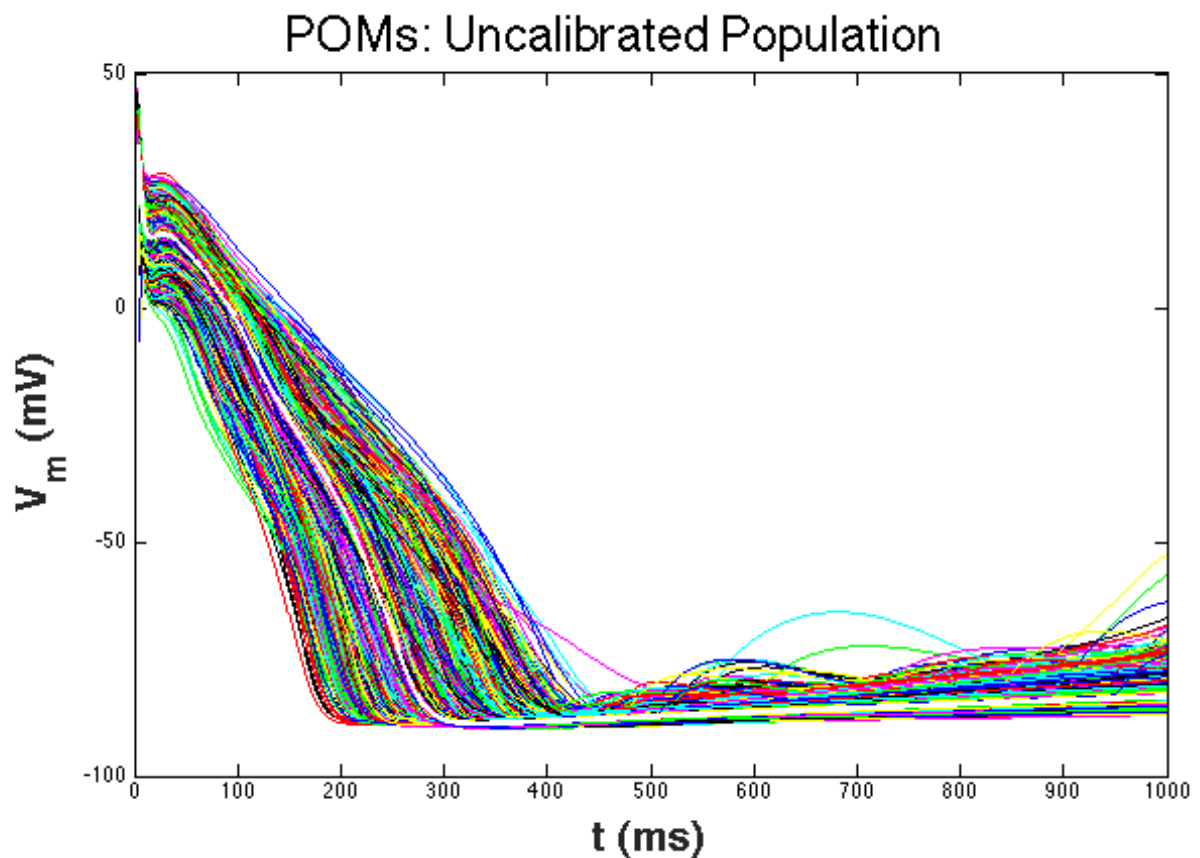


Figura MM-6. Popolazione di modelli generata dalla variazione di alcuni parametri del nuovo modello del PA di cellula umana di Purkinje. Tutte le tracce sono state registrate in Steady State, dopo 500 battiti.

Simulazioni

Le equazioni differenziali del modello sono state implementate in Matlab (Mathworks Inc.) e risolte tramite un solver (ode15s), a passo variabile. Il modello è stato stimolato ad 1Hz fino al raggiungimento dello stato stazionario e successivamente sono stati calcolati i biomarker elencati in tabella 6.

Per le simulazioni *in silico* dei Voltage Clamp, sono state implementate le stesse concentrazioni utilizzate *in vitro* da Han e riportate in Tabella 4. Inoltre sono stati riprodotti gli stessi protocolli di stimolazione della membrana cellulare.

La popolazione è stata generata tramite l'utilizzo del cluster dell'Università di Oxford (ARCUS), per il calcolo computazione in parallelo, in ambiente Linux. Il codice è stato implementato in Matlab, utilizzando i comandi per il calcolo in parallelo (es. *parfor*). Sono stati usati 36 calcolatori, ciascuno con 8 processori. Il tempo di generazione della popolazione di 3000 modelli in Steady State (raggiunto dopo 500 battiti) è stato di un giorno, 13 h e 33'.

Il modello di Stewart, per il calcolo dei biomarker, è stato convertito automaticamente, da OpenCor a Matlab.

Il modello PRd è stato convertito manualmente in Matlab dal codice reso disponibile dagli autori in C++.

Risultati

Modellizzazione delle correnti ioniche

Correnti ioniche aggiunte al modello ORd

Le correnti introdotte *ex novo* nel modello ORd sono 3: la *sustained current* I_{sus} , la *corrente di calcio di tipo T*, I_{CaT} , e la *hyperpolarization-activated current* I_f , detta anche corrente funny.

I_{sus} è stata modellizzata sulla base della formulazione usata da Stewart (Stewart et al. 2009) tramite un unico gate di attivazione voltaggio-dipendente, $asus$, fittando i dati in Voltage Clamp pubblicati in Han et al. 2012. Per poter ricostruire la formulazione di $asus$, tali dati sono stati divisi per la corrispondente *driving force* (ovvero la differenza tra il potenziale di membrana e quello di Nerst della specifica specie ionica), per ottenere la conduttanza della corrente, e normalizzati rispetto al valore massimo. Le figure R-1 e R-2, riportano rispettivamente il fitting di $asus$ e la curva I-V normalizzata di I_{sus} .

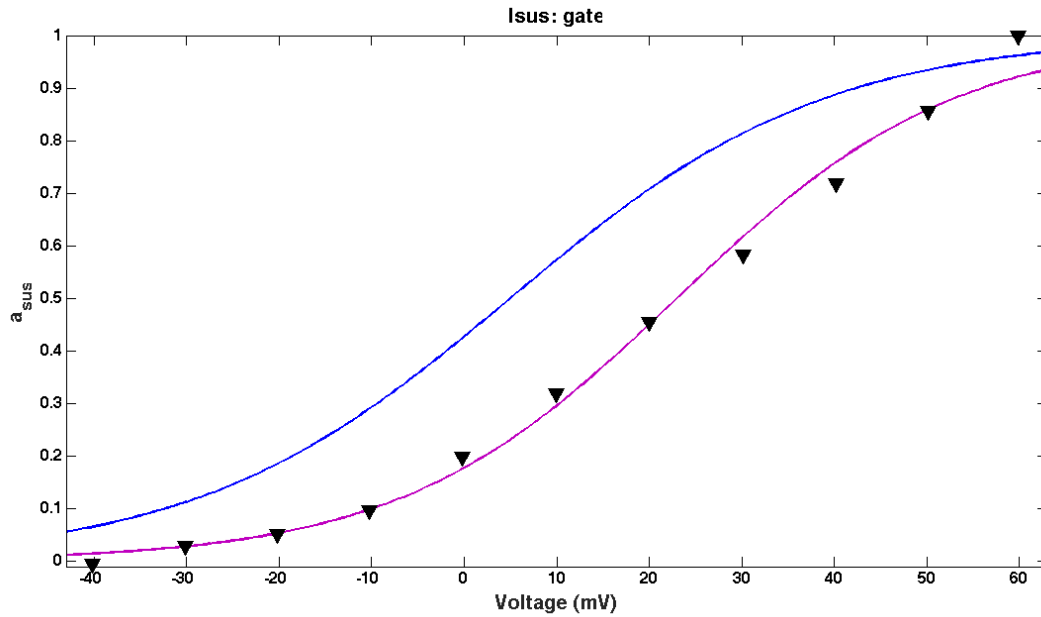


Figura R-1. Confronto della curva di attivazione di I_{sus} in steady state: modello di STW (linea blu), il nuovo modello di Pj (linea rosa) e i dati sperimentali ricavati da Han (triangoli neri)

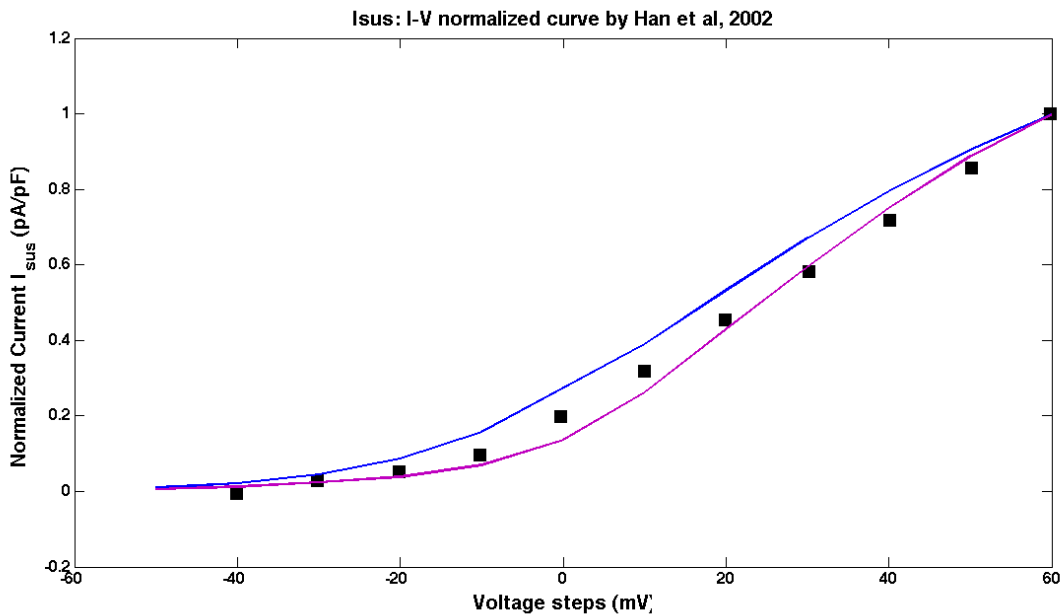


Figura R-2. Confronto della curva I-V della corrente I_{sus} : modello di STW (in blu), il nuovo modello di Purkinje cardiaco (linea viola) e i dati sperimentali di Han (quadrati neri). Valori normalizzati rispetto al valore assoluto del picco di corrente.

Della corrente I_{CaT} , quasi del tutto assente nei VMs, non esistono dati umani relativi alle P-cell, pertanto si è utilizzata la formulazione matematica elaborata da Li e Rudy per la cellula di Purkinje canina (Li & Rudy 2011). Tale formulazione è costituita da due variabili di gating tempo-varianti e voltaggio-dipendenti, una di attivazione e l'altra di inattivazione. Queste ultime sono state ricavate da dati

sperimentali sempre di Han et al., ma in questo caso relativi ad un modello cellulare canino (Han *et al.*, 2001). Si riportano in figura R-3, gli andamenti in steady state di entrambi i gate e la corrispondente curva I-V.

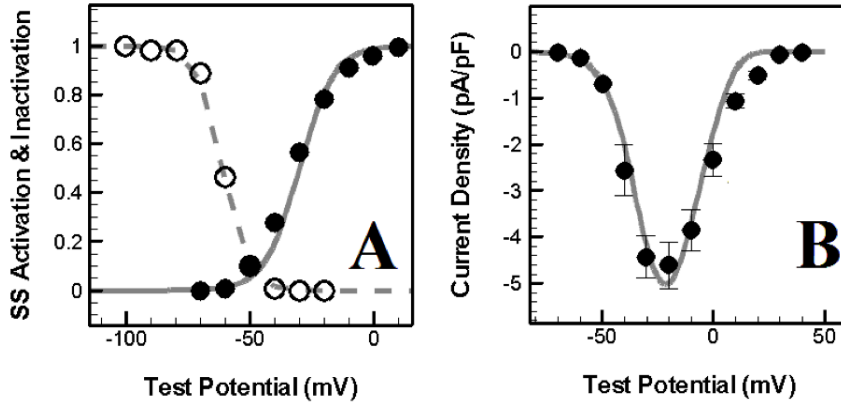


Figura R-3. Validazione di ICaT da (Li & Rudy 2011). Dati sperimentali (punti neri) da Han *et al.*, 2001. (A) Andamento in Steady State della variabile di attivazione e di inattivazione (in grigio). (B) Curva I-V registrata in Voltage clamp.

Per la modellizzazione di I_f , assente nei VM e responsabile del pacemaking della cellula, è stata utilizzata la stessa formulazione utilizzata da Stewart, che a sua volta era basata sui dati umani di Han et al. 2002. Tale formulazione consiste di due componenti: una relativa al flusso di ioni K^+ , $I_{f,K}$, l'altra al flusso di ioni Na^+ , $I_{f,Na}$. Tali componenti sono formulate utilizzando un formalismo di tipo Hodgkin Huxley, e contengono lo stesso gate di attivazione (y) voltaggio-dipendente e tempo variante.

Si riportano in figura R-4 le tracce di corrente e la curva I-V, fornita da Stewart.

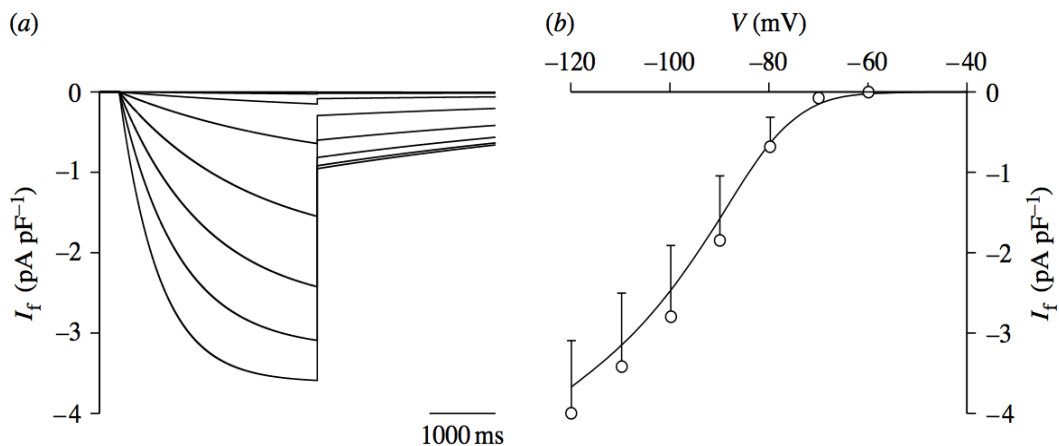


Figura R-4. Corrente I_f in STW. (a) Tracce di corrente simulate (b) curva I-V: dati sperimentali da Han *et al.*, 2002 (punti bianchi) e simulazione di STW (in grigio). Modificata da Stewart *et al.*, 2009

Correnti Ioniche presenti ma modificate

Le correnti di cui è stata modificata la modellazione rispetto al modello ORd sono la *corrente di sodio veloce*, I_{Na} , la *corrente di calcio di tipo L*, I_{CaL} , la *transiente uscente di potassio*, I_{to} , e la *rettificante entrante* I_{K1} .

La corrente I_{Na} è stata ereditata dalla formulazione di Passini (Passini, 2015). Essa è ricavata da quella di ORd, eccezion fatta per i gate di inattivazione, h e j , che sono stati rimodellati fittando la formulazione di ORd su quella di TT04, come mostrato in figura R-7.

Per riprodurre l'elevata velocità di depolarizzazione mostrata dalle P-cells (Vigmond & Stuyvers 2015; Nagy et al. 2015; Dun & Boyden, 2008), la conduttanza delle corrente del I_{Na} è stata aumentata del 30%.

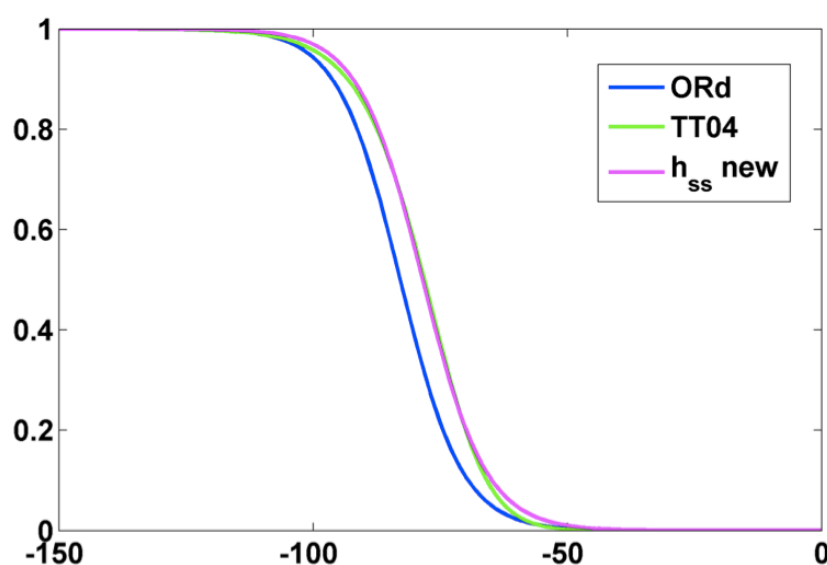


Figura R-7. Confronto del gate di inattivazione della corrente I_{Na} per i modelli ORd, TT04 e il nuovo modello di Purkinje, così come utilizzata da Passini, 2015

Non esistono dati registrati in voltage clamp, su campioni sperimentali umani, di correnti di Ca di tipo L per fibre di Purkinje cardiaco. La modellizzazione di I_{CaL} , pertanto, è avvenuta a partire da quella ventricolare di ORd. Tuttavia l'implementazione di una diversa compartimentazione dello spazio intracellulare e del SR ha richiesto alcune modifiche rispetto alla formulazione di ORd. In

particolare, sono state modificate le formulazioni delle costanti di tempo lente per i gate di inattivazione voltaggio-dipendente e calcio-dipendente. Le due curve sono state rese simmetriche, rispetto al proprio valor massimo, come mostrato in figura R-8.

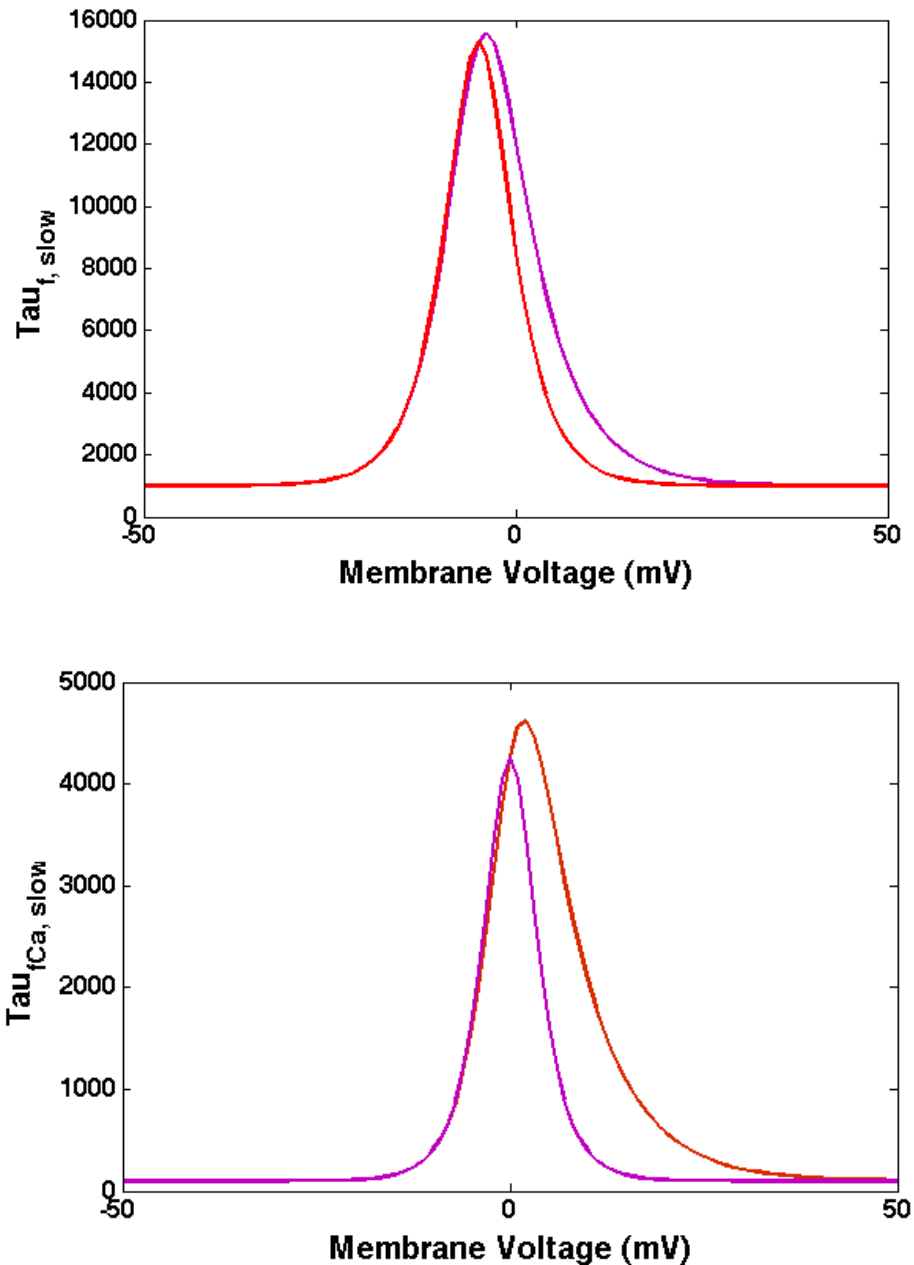


Figura R-8. Confronto della modellazione dei gate di inattivazione voltaggio-dipendente (in alto) e calcio-dipendente (in basso): ORD (linea rossa) e il nuovo modello di Purkinje (linea rosa)

La formulazione della corrente I_{t0} è stata basata sulla formulazione di STW, modificata per riprodurre al meglio i corrispondenti dati di Han *et al.* Tale formulazione, implementata con un formalismo di tipo H&H, consta di 3 gate: 1 di

attivazione e 2 di inattivazione (rapida e lenta). Si riportano in figura R-9 gli andamenti in steady state dei gate di attivazione e inattivazione, e delle due costanti di tempo di inattivazione. Non esistono dati umani relativi alla costante di tempo di attivazione, di cui si è mantenuta la formulazione proposta da STW.

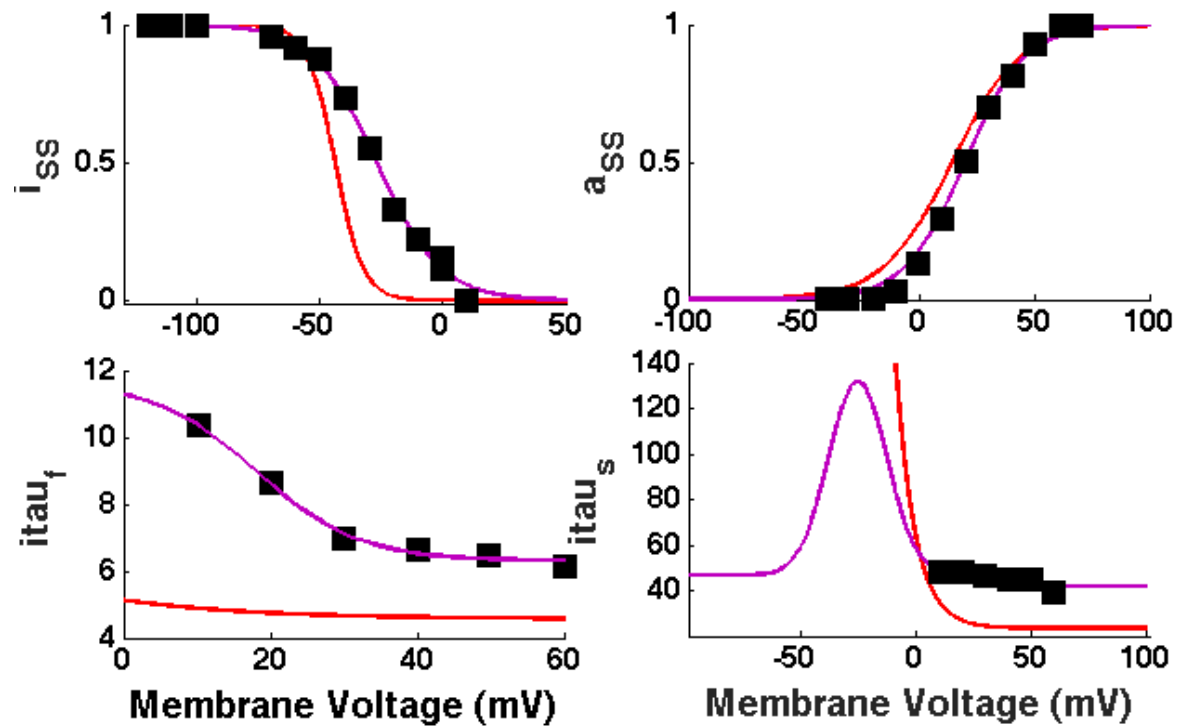


Figura R-9. Modellazione di I_{to} . Confronto tra il nuovo modello (linea rosa) e il modello ORd (linea rossa): gate di inattivazione (In alto a sinistra), gate di attivazione (in alto a destra), costante di tempo dell'inattivazione veloce (in basso a sinistra) e costante di tempo di inattivazione lenta (in basso a destra). Dati sperimentali (box neri) da Han *et al.*, 2002.

Infine, si riporta in figura R-10 la curva I-V di I_{to} e i dati sperimentali in voltage clamp di Han, normalizzati rispetto al picco di corrente. La conduttanza massima di canale è stata determinata in prima approssimazione, dal fitting dei dati di Han *et al.*, 2002 a monte della normalizzazione

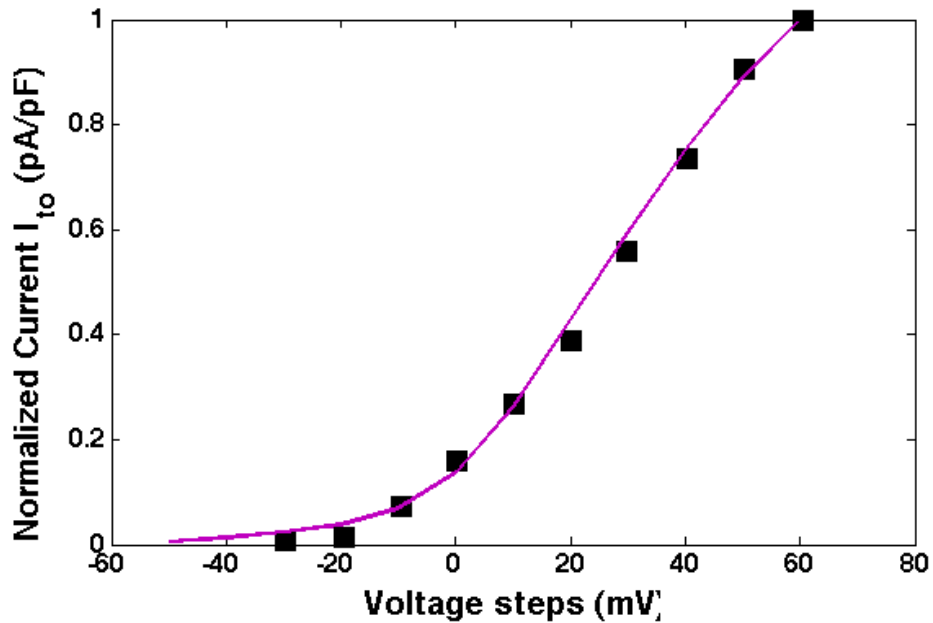


Figura R.10. Curva I-V normalizzata di I_{to} : dati sperimentali da Han *et al.*, 2002 (box neri); simulazione del nuovo modello (linea rosa).

Per la corrente I_{K1} è stata mantenuta la formulazione proposta in ORd, costituita da gate di inattivazione istantaneo voltaggio-dipendente ed uno di attivazione tempo-variante, sempre voltaggio dipendente. Tale variabile di inattivazione è stata riformulata prendendo come riferimento i dati di Han. Tali dati sono stati traslati di -14 mV, per far coincidere il potenziale di inversione della corrente I_{K1} con il potenziale di equilibrio ricavato dalla formula di Nernst per le concentrazioni di K^+ utilizzate nell'intra ed extra cellulare, come mostrato in figura R-11.

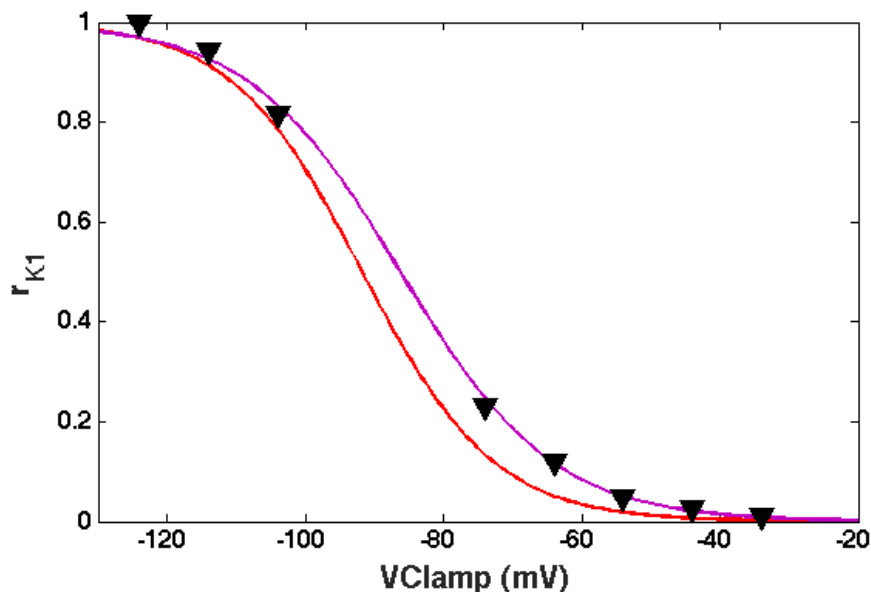


Figura R-11. Confronto tra le formulazioni della variabile di inattivazione della I_{to} : ORd (linea rossa), nuovo modello (linea rosa). Dati sperimentali elaborati da Han *et al.*, 2002 (triangoli neri).

In figura R-12, si riporta, infine, la curva I-V normalizzata della nuova formulazione di I_{K1} . Inoltre, in accordo con i dati in letteratura e di Han, la conduttanza massima del canale è stata ridotta del 71%, rispetto al valore in ORd.

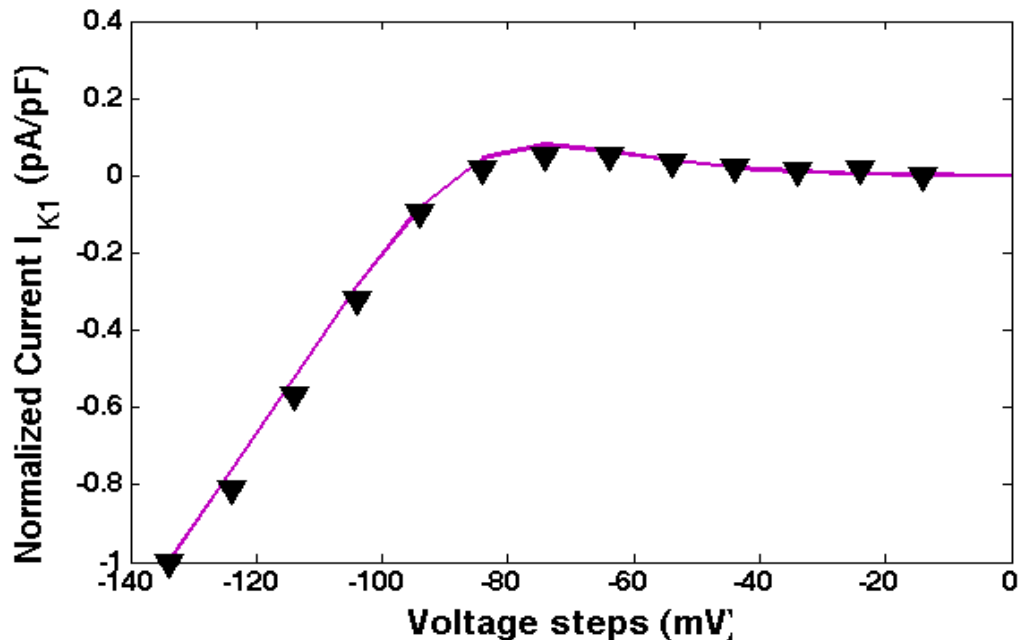


Figura R-12. Confronto della curva I-V per I_{K1} : dati sperimentali elaborati da Han et al., 2002 (triangoli neri); nuovo modello di Purkinje cardiaco (curva rosa)

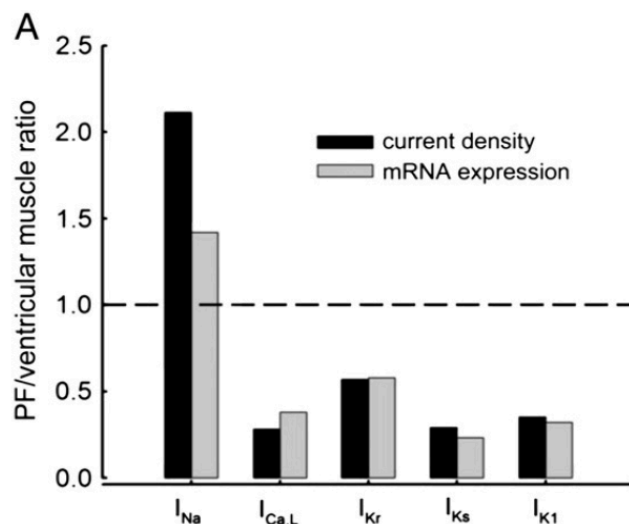


Figura R13. Rapporto tra la densità di corrente (in nero) e l'espressione di mRNA di canale (in grigio) delle correnti I_{Na} , $I_{Ca,L}$, I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1} , nelle P-cells e VMs di un modello sperimentale di coniglio. Modificata da Aslanidi et al., 2010

Per la corrente del Sodio ritardata, I_{NaL} , è stata mantenuta inalterata la formulazione matematica presente nel modello ORd. Tuttavia, la relativa conduttanza è stata modificata in accordo con i dati presenti in letteratura. Dal momento che non esistono dati umani di Purkinje cardiaco in Voltage Clamp per questa corrente, la conduttanza della I_{NaL} è stata aumentata di circa 2.5 volte rispetto al valore presente in ORd, in

accordo con quanto pubblicato su un campione di cellule del Purkinje di coniglio da Aslanidi (Aslanidi et al. 2010) (figura R-13).

Il modello di base

Integrando tutte le correnti descritte nella sezione precedente, si è ottenuto un nuovo modello di potenziale d'azione cardiaco per cellule del Purkinje. Geometricamente la cellula è stata modellizzata come un cilindro di dimensioni uguali al modello ORd, non essendo state evidenziate grandi differenze tra i cardiomiociti ventricolari e le P-cells, che nell'uomo appaiano meno spesse che in altre specie (Ono et al. 2009).

Il potenziale di membrana è espresso dalla M.1, mentre il bilancio delle correnti ioniche è data dalla M.2, in cui compaiono correnti aggiunte, non esistenti in ORd, correnti riformulate e correnti non modificate rispetto a ORd.

Le concentrazioni intra ed extra cellulari, il valore dei parametri e delle equazioni di tutte le correnti sono consultabili in appendice A.

Si riporta in figura R-14, l'andamento del PA determinato dalla M.1, con stimolazione ad 1 Hz, impulsi di 1 ms, in steady state, dopo 1000 battiti, in confronto con i modelli STW e ORd, anch'essi in steady state. In figura R-15, sono invece riportati, i valori di concentrazione intracellulare Na^+ , K^+ e Ca^{2+} in funzione del numero di battiti.

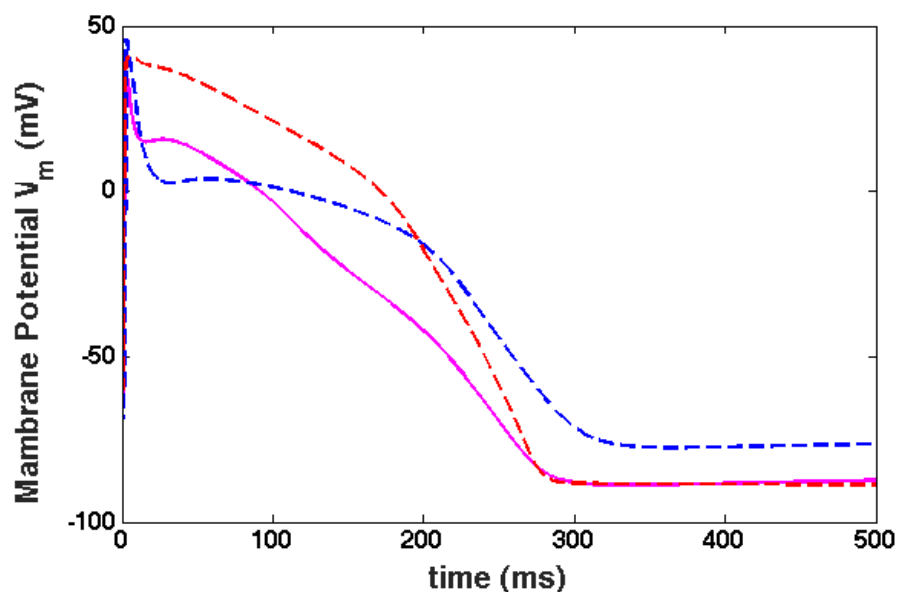


Figura R-14. Confronto tra i PA di: STW (tratteggio blu), ORd (tratteggio rosso) e del nuovo modello di Purkinje cardiaco umano (linea continua viola).

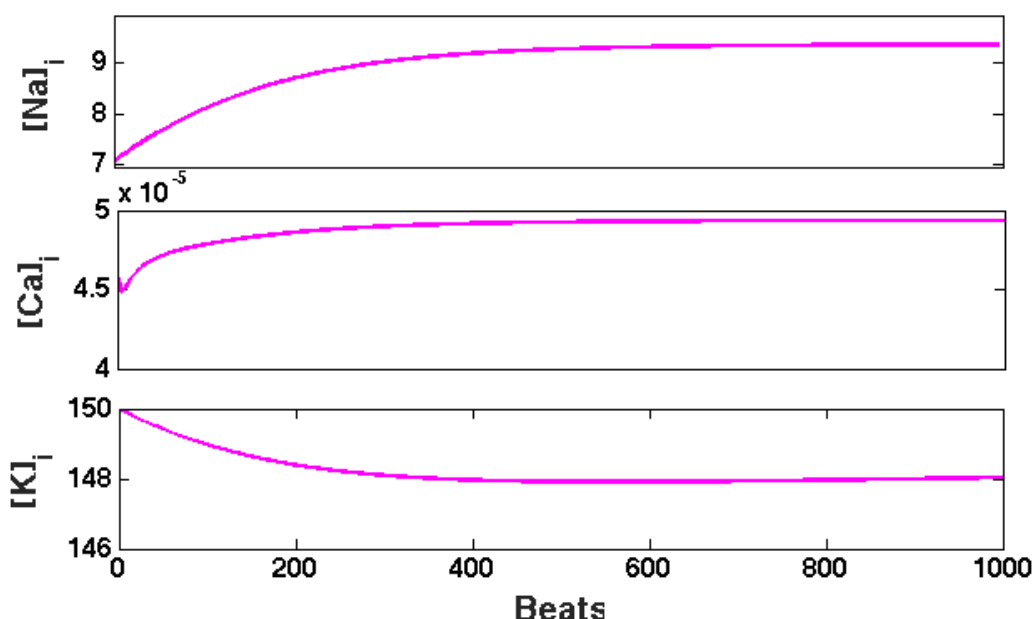


Figura R-15. Andamento delle concentrazioni intracellulari di Na^+ , K^+ e Ca^{2+} al termine di ogni battito, fino al raggiungimento dello steady state, intorno ai 1000 battiti.

Il PA così ottenuto mostra le principali caratteristiche delle cellule del Purkinje: alta velocità di depolarizzazione, un picco ridotto, una morfologia di tipo “spike and dome”, e un plateau più positivo. Si riportano in tabella R-1, i biomarker già illustrati in tabella MM-2, per il nuovo modello Pj.

TOP (mV)	EOP (mV)	AMP (mV)	dVmax (mV/ms)	APD90 (ms)	APD75 (ms)	APD50 (ms)	APD25 (ms)	APD10 (ms)
-82.66	-82.68	117.57	305.42	250.5	220.5	147.5	72.5	4.75

Tabella R-1. Biomarker del PA simulato dal nuovo modello di Purkinje. Tutti i biomarker (eccetto AMP) rientrano nei range di valori riscontrati nel dataset sperimentale, riportati in tabella MM-3.

Tuttavia, a differenza di STW, il presente modello di Purkinje, non mostra attività autoritmica, a parità di I_f . Ciò, non deve stupire, essendo molto differente la modellazione dei canali della I_{Na} . Nel modello ORd, infatti, i canali del sodio si attivano più lentamente e si inattivano più velocemente rispetto al modello TT04, figure R-5 e R-6, su cui si basa la modellizzazione della corrente del sodio di STW. L’attivazione più lenta e l’inattivazione più veloce, comportano una reattività più lenta della I_{Na} alla depolarizzazione prodotta da I_f , che dunque non riesce a dare origine ad un potenziale spontaneo, neanche in presenza di un largo intervallo

diastolico. Il potenziale di membrana sale lentamente durante questa fase, ma non è sufficiente a raggiungere la soglia richiesta per la generazione di un potenziale d'azione non stimolato. La cellula resta, dunque, polarizzata, fino alla stimolazione successiva.

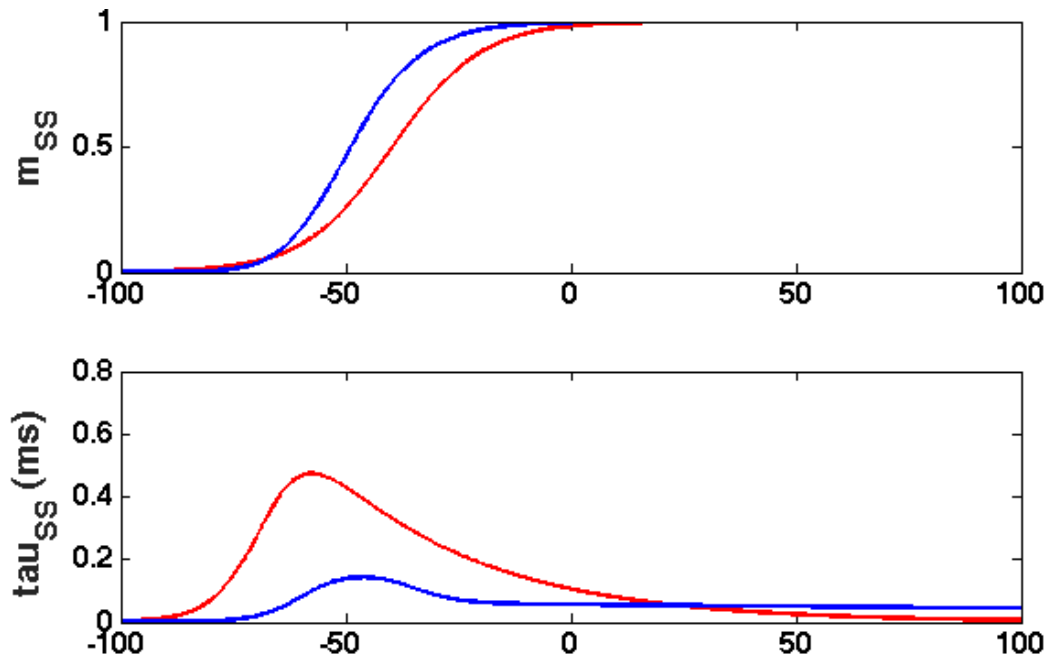


Figura R-5. Andamento del gate di attivazione in Steady State (in alto) e relativa costante di tempo (in basso) per la corrente I_{Na} in ORd (rosso) e STW-TT04 (in blu).

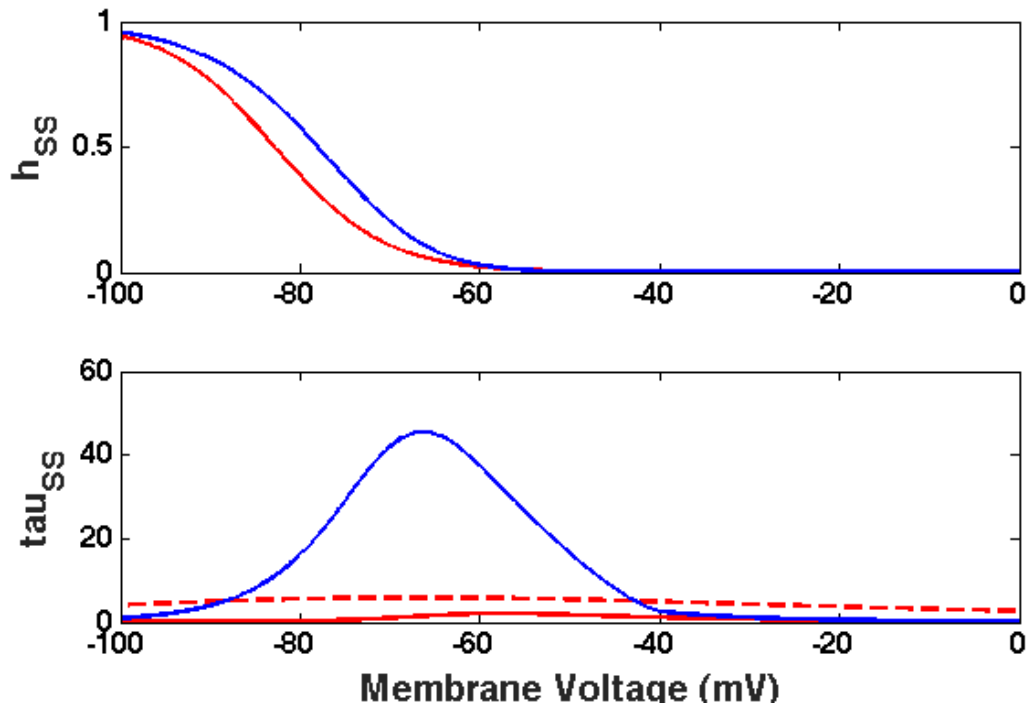


Figura R-6. Andamento del gate di inattivazione in Steady State (in alto) e relativa costante di tempo (in basso) per la corrente I_{Na} in ORd (rosso, continua per la componente veloce, tratto per la componente lenta) e STW-TT04 (in blu).

POMs: Popolazione di Modelli

Una volta definito il modello di base, si è quindi passati alla costruzione di una popolazione di modelli, basata sui dati sperimentali umani forniti dall'Università di Szeged. In questo caso infatti, l'approccio POMs è fondamentale per adattare il modello di base ai dati sperimentali, permettendo di rinifire le conduttanze per riprodurre lo spazio dei biomarkers considerato.

Come descritto in dettaglio nella sezione Materiali e Metodi, dal nuovo modello di base di cellula cardiaca di Purkinje, è stata generata una popolazione di 3000 modelli, variando i valori nominali di 14 parametri del modello di base nell'intervallo [50 - 150]%, per rappresentare una popolazione di modelli di controllo, ovvero sani.

Si riporta in figura R-16 l'intera popolazione iniziale generata: è facile notare che alcuni modelli mostrano DADs, probabilmente dovuti ad una particolare combinazione di conduttanze che li ha resi più sensibili. Questi modelli saranno analizzati in seguito. Nessun modello mostra invece EADs, come era prevedibile dal momento che nel range di variazione dei parametri considerato (50-150%) la corrente I_{KR} non è inibita a tal punto da causare la ri-attivazione della corrente I_{CaL} , principale responsabile delle EADs.

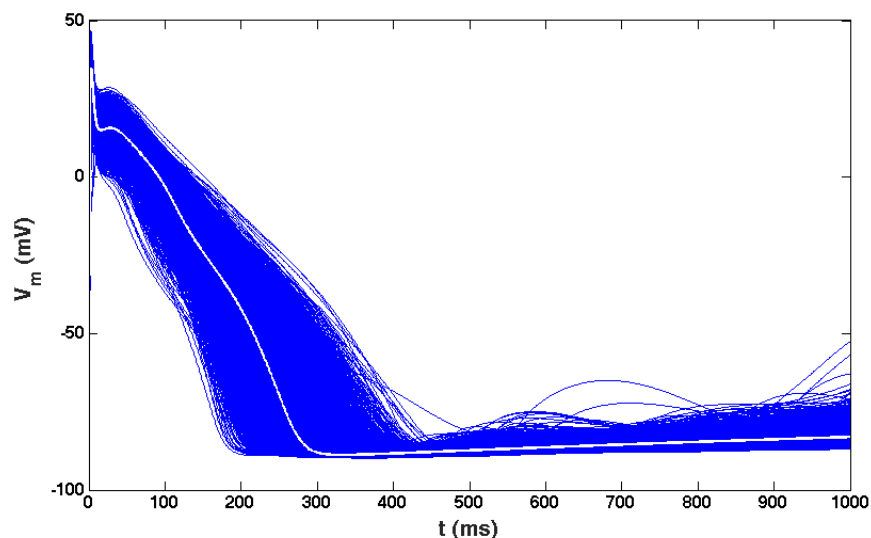


Figura R-16. PA generati dall'intera Popolazione di modelli generata a partire dal modello medio: in blu i 3000 modelli, in bianco il modello medio. È già possibile osservare la presenza di DADs, sotto opportune condizioni.

Dalla popolazione iniziale è quindi iniziato un processo di calibrazione, volto a scartare tutti i modelli “non utili”, ovvero non in linea con i dati sperimentali o rappresentanti una condizione non fisiologia.

Come prima cosa, è stata applicato un filtro per identificare i modelli che presentano DADs. Il filtro è stato implementato in Matlab, attraverso la sogliatura della derivata prima e della derivata seconda del PA rispetto al tempo. Si riportano i risultati in figura R-17, ove in blu sono riportati i modelli che non presentano DADs e in grigio quelli scartati.

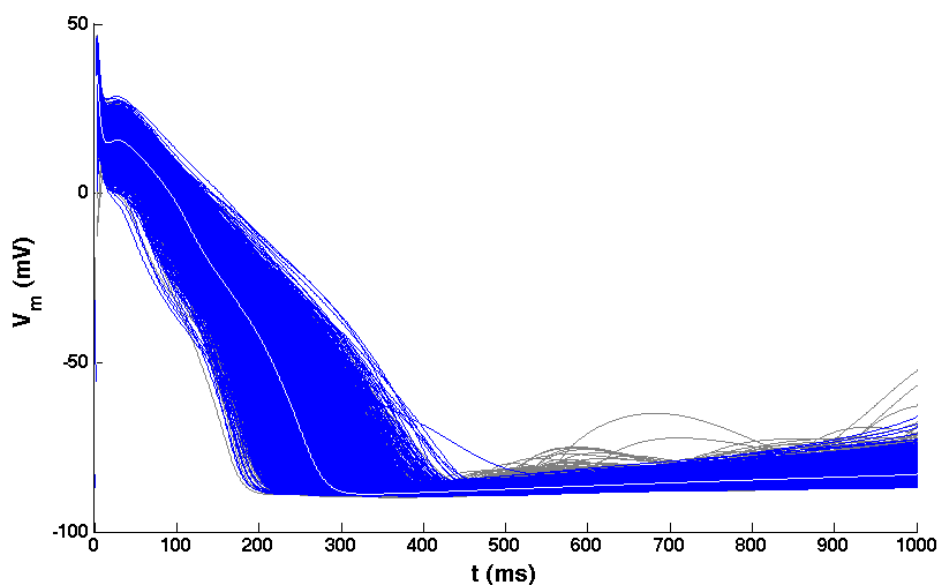


Figura R-17. Primo step del processo di calibrazione: i modelli che in condizioni normali mostrano DADs (in grigio) vengono scartati dal resto della popolazione (in blu). Il modello di base, al centro della popolazione, è indicato in bianco.

Il secondo stadio di calibrazione è stato basato sui dati sperimentali, ovvero considerando i range dei biomarker presentati in tabella MM-3. I modelli i cui biomarker hanno valori compresi all’interno del range sperimentale (min max) vengono accettati e mantenuti nella popolazione calibrata, mentre gli altri sono scartati.

Considerando i risultati di questo processo di calibrazione, si è scelto di non scartare i modelli che presentavano un’ampiezza (AMP) superiore al massimo valore sperimentale. Infatti, dal momento che il modello di base è stato costruito a partire dal modello ORd, ha ereditato da esso un’ampiezza elevata, dovuta alla formulazione della Ina in tale modello. Selezionare soltanto i modelli con

un'ampiezza ridotta, avrebbe comportato una notevole riduzione della DV_{max} , caratteristica importante delle cellule di Purkinje, dato il ruolo importante nella propagazione veloce dell'impulso elettrico.

Una rappresentazione visuale del processo di calibrazione è riportata in figura R-19: qui sono riportati tutti i modelli nello spazio dei biomarker, considerando l'APD90 in funzione di tutti gli altri biomarker: è evidente come la maggior parte dei modelli si trovi al di fuori del range sperimentale per tale biomarker.

Al termine dei primi due step di calibrazione, 1041 modelli (rispetto ai 3000 di partenza) sono rimasti nella popolazione. Si riporta in figura R-19 il confronto tra la popolazione calibrata e le stesse tracce sperimentali riportate in figura MM-2.

Infine si riportano in figura R-20 e R-21, rispettivamente, gli andamenti delle concentrazioni ioniche di K^+ , Na^+ e Ca^{2+} della popolazione calibrata e la dinamica in funzione del tempo dell'ultimo battito del Ca^{2+} . Dalle figure R-20 e R-21 è possibile osservare che tutte le tracce scartate presentano delle alterate dinamiche del Ca^{2+} e/o concentrazioni intracellulari più elevate di Ca^{2+} diastolico.

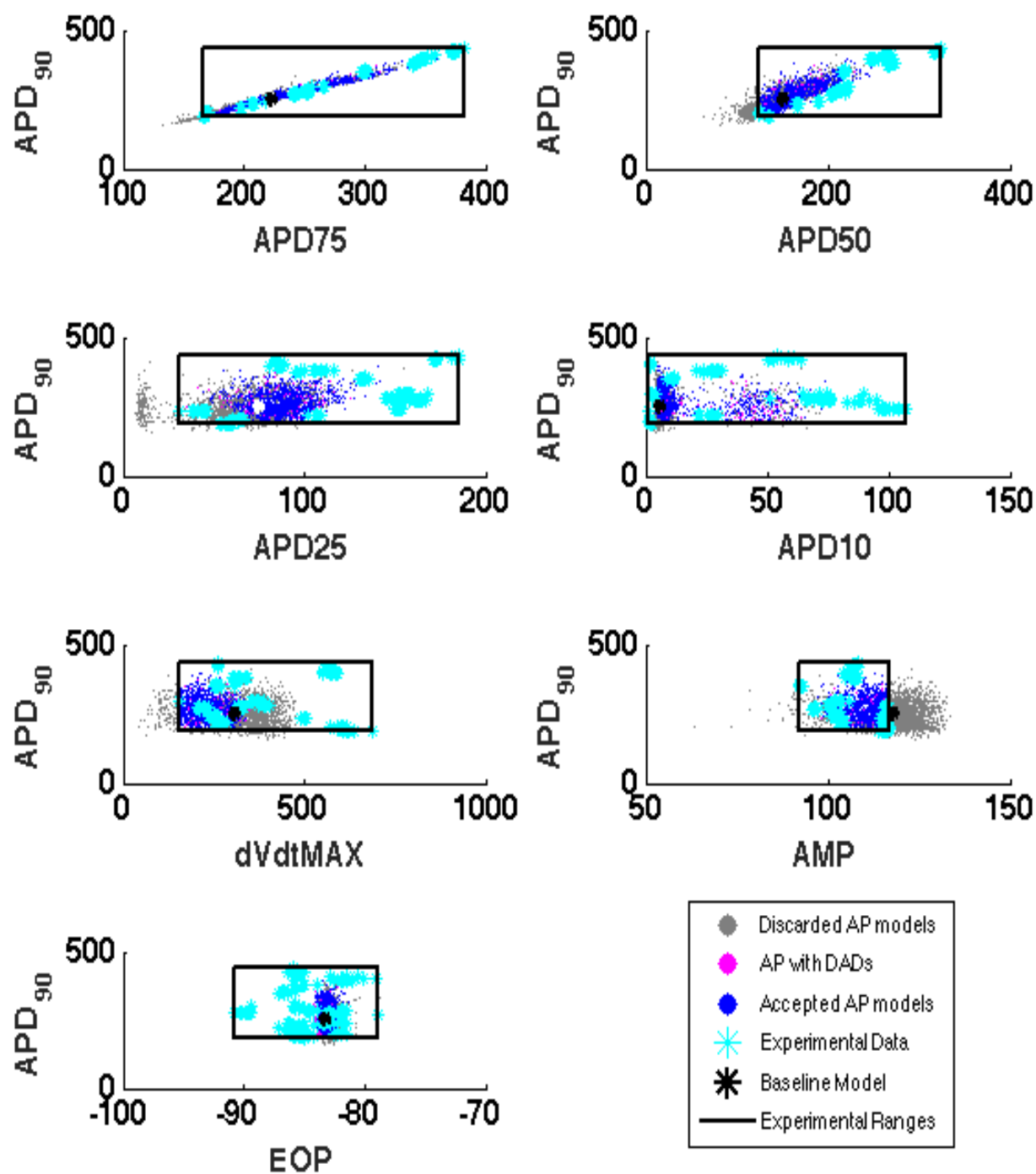


Figura R-18. Rappresentazione visiva della popolazione di modelli nello spazio dei parametri: modelli scartati (punti grigi), modelli che generano DADs (punti rosa), modelli accettati (punti blu), dati sperimentali (asterischi azzurri), modello di base (asterisco nero), range sperimentali (rettangoli neri).

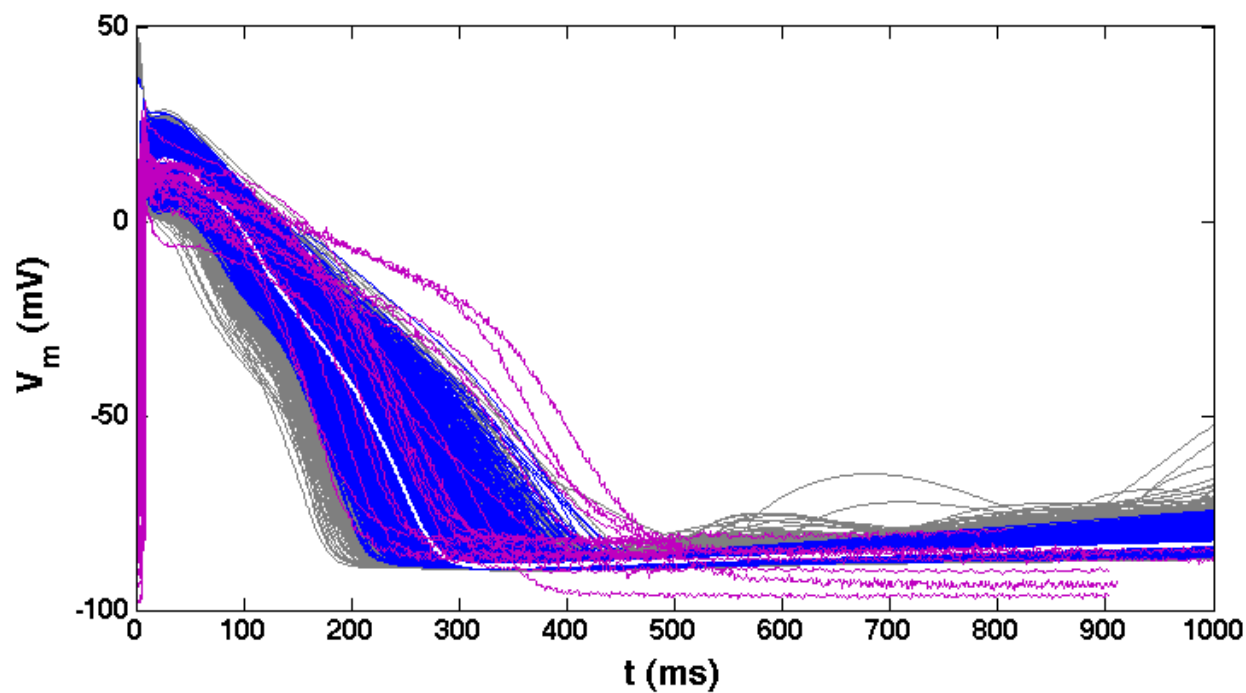


Figura R-19. Popolazione di 3000 modelli al 2° step di calibrazione: modelli accettati (in blu), modelli scartati (in grigio), modello di base (in bianco), dati sperimentali (in rosa).

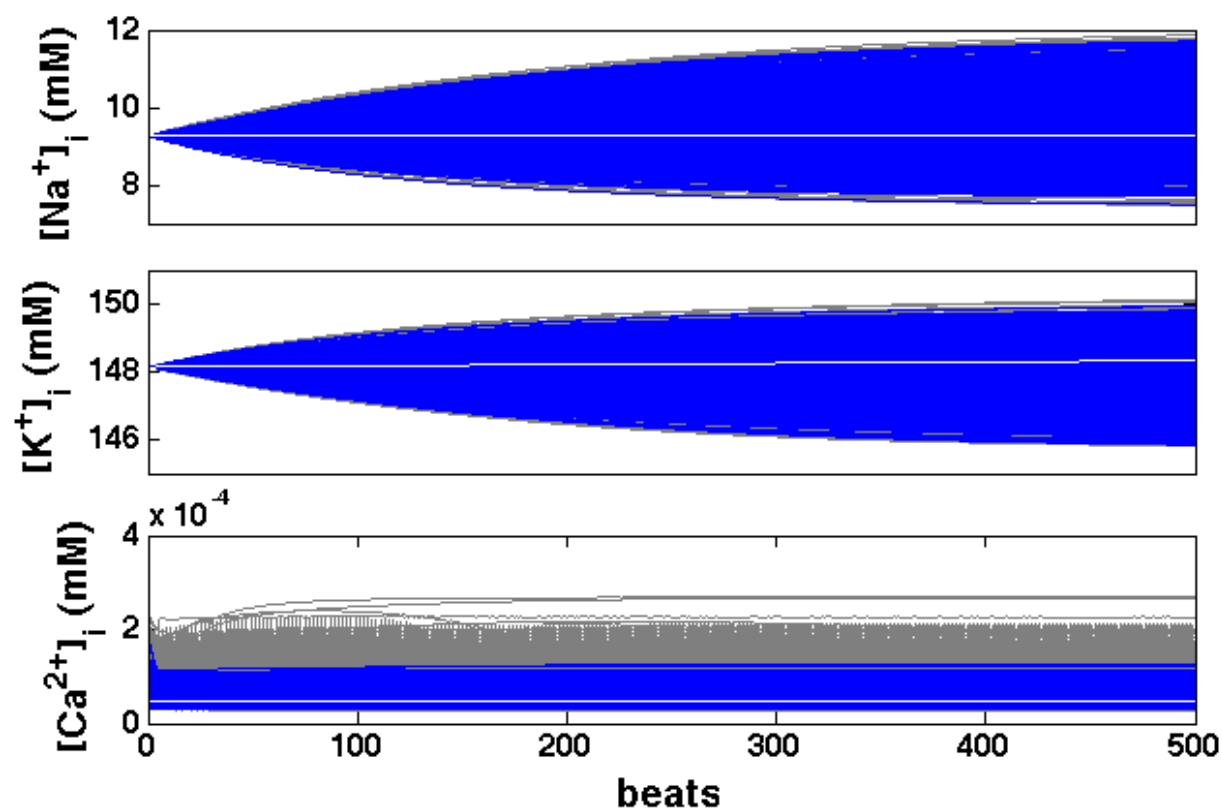


Figura R-20. Popolazione di 3000 modelli al 2° step di calibrazione: concentrazioni intracellulari di Na^+ (in alto), K^+ (in mezzo) e Ca^{2+} (in basso). Modelli accettati (blu), Modelli scartati (in grigio), Modello di base (in bianco).

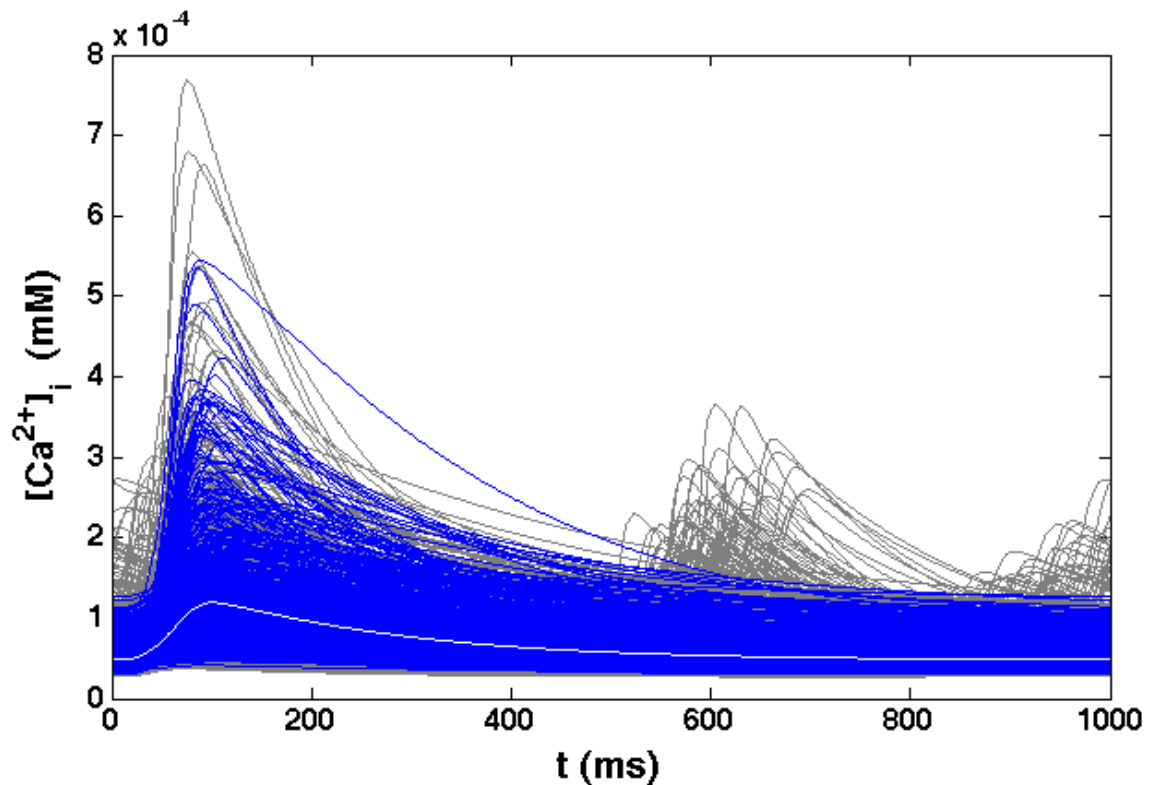


Figura R-21 Popolazione di 3000 modelli al 2° step di calibrazione: concentrazioni intracellulari di Na^+ (in alto), K^+ (in mezzo) e Ca^{2+} (in basso). Modelli accettati (blu), Modelli scartati (in grigio), Modello di base (in bianco).

Infine, l'ultimo passaggio della calibrazione ha riguardato una rifinitura della popolazione per eliminare la "repentina curvatura" del potenziale durante la fase di ripolarizzazione (si veda ad esempio la traccia bianca in Figura R-19 a circa 120 ms), che non è stata riscontrata nelle tracce sperimentali ed è quindi dovuta ad un errato bilancio delle conduttanze di corrente. In questo caso, è stato applicato ai 1041 modelli un filtro sulla derivata seconda, ovvero è stata imposta una discesa "smooth", senza cambi di curvatura. I modelli che hanno superato quest'ultima fase sono stati 76, che costituiscono quindi la nostra popolazione finale, mostrata in figura R-22.

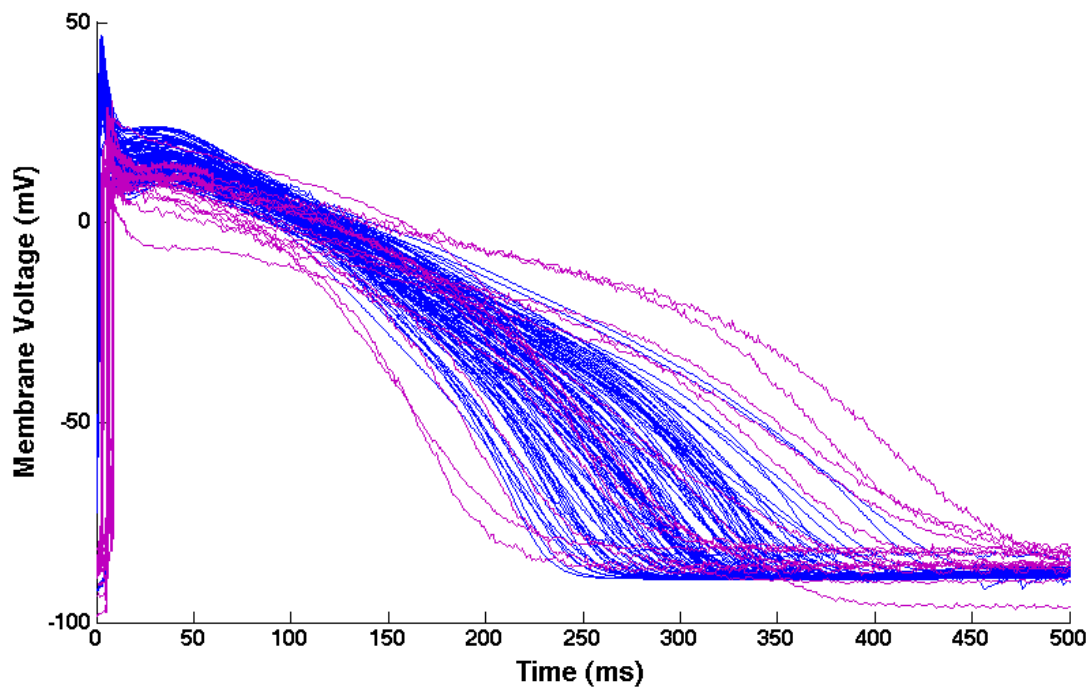


Figura R-22. Popolazione di modelli finale (in blu), confrontata con le tracce sperimentali di PA (in rosa).

Modelli che mostrano DADs

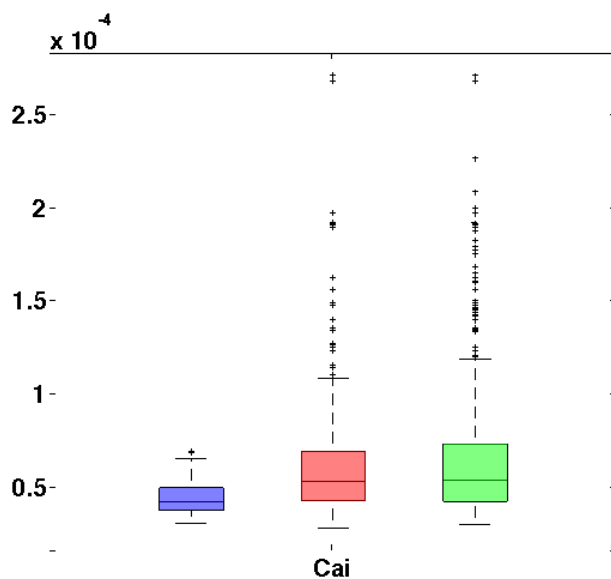


Figura R-23. Concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare diastolico nei modelli della popolazione calibrata (in blu), nei modelli che non hanno superato la calibrazione (in rosso) e nei modelli che mostravano DADs (in verde)

Di tutti i modelli scartati durante i primi due step di calibrazione, 653 mostrano DADs. Tali modelli sono anche caratterizzati da concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare diastolico molto superiori rispetto al modello di base (figura R-23). Analizzando la distribuzione delle conduttanze

ioniche in tali modelli, è possibile notare alcune differenze rispetto ai modelli che non producono DADs

(figura R-24). In particolare, tali modelli sono caratterizzati da elevate conduttanze sia per la pompa SERCA, che si occupa di riportare il Ca^{2+} all'interno del reticolo sarcoplasmatico, che per i RyR, canali che rilasciano il calcio dal reticolo stesso. Il primo potrebbe contribuire ad aumentare il livello di Ca^{2+}

intracellulare, mentre il secondo potrebbe essere responsabile di un sovraccarico del reticolo, e quindi aumentare la probabilità di rilasci spontanei. Queste ipotesi verranno testate in uno studio futuro, più specifico, e volto proprio a chiarire i meccanismi alla base di fenomeni pro-aritmici quali DADs e EADs nelle P-cell umane.

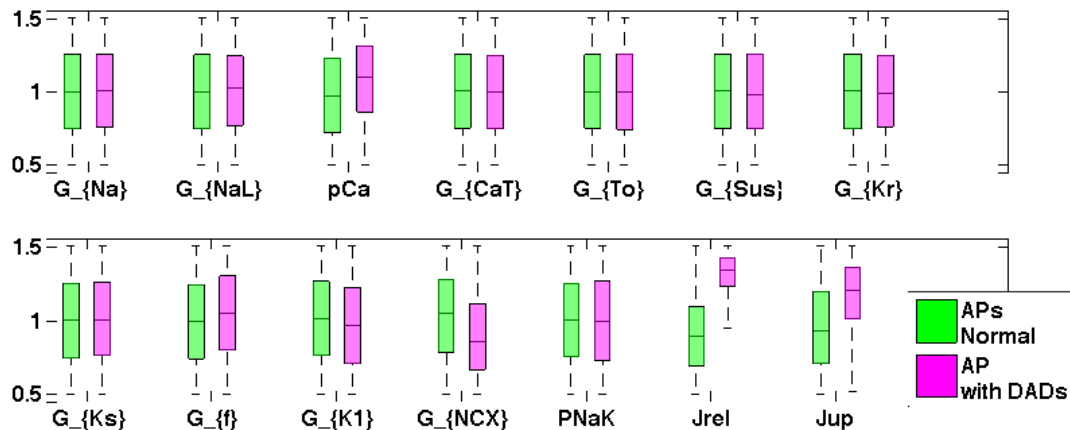


Figura R.24. Boxplot dei fattori di scala di tutti i modelli che non mostrano anomalità nel PA (in verde) e di quelli che producono DADs (in rosa).

Dalla Popolazione al Modello Medio

Dalla Popolazione di modelli così ottenuta (76 modelli) abbiamo voluto ricondurci ad un nuovo modello medio, non più basato soltanto sui dati di Han et al, ma questa volta arricchito con i dati sperimentali disponibili in current clamp. Tale modello medio, potrà a sua volta diventare il punto di partenza di nuovi studi.

I parametri del modello medio sono stati ottenuti mediando i valori sulla popolazione calibrata, e le variazioni rispetto al modello di base sono evidenziate in Figura R-25. In particolare, I_{CaL} e I_{sus} sono state ridotte rispettivamente del 25% e del 34%, mentre la conduttanza dello scambiatore $Na^+ - Ca^{2+}$ è stata aumentata del 37%.

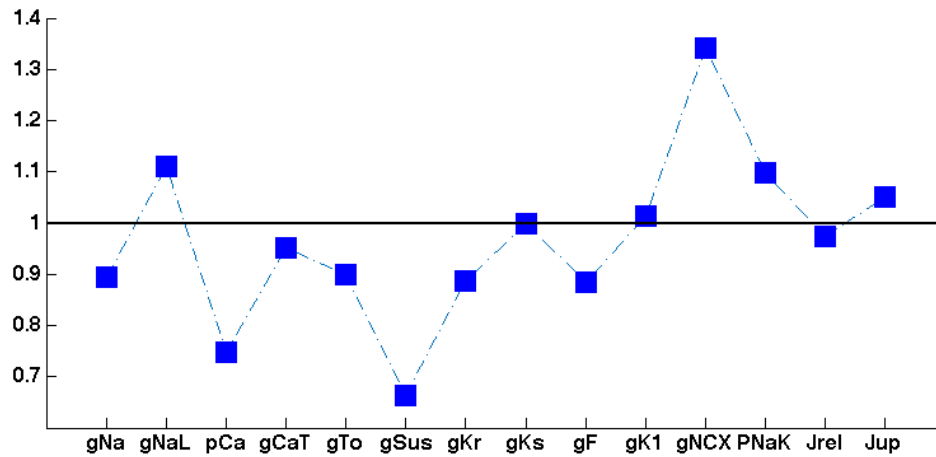


Figura R.25. Coefficienti del modello medio umano di Purkinje cardiaco, rispetto al modello medio su cui si è costruita la popolazione: $G_{Na} = 0.86$, $G_{NaL} = 1.09$, $pCa = 0.75$, $G_{CaT} = 0.94$, $G_{to} = 0.87$, $G_{sus} = 0.66$, $G_{Kr} = 0.86$, $G_{Ks} = 0.97$, $G_f = 0.82$, $G_{K1} = 0.98$, $G_{NCX} = 1.37$, $G_{PNaK} = 1.16$, $G_{Jrel} = 0.96$, $G_{Jup} = 1.1$.

La figura R-26 mostra come il nuovo modello medio ben rappresenti le tracce sperimentali umane usate per la calibrazione, confermando così le popolazioni di modelli come una metodologia molto utile per adattare un generico modello (in questo caso il modello di base) per riprodurre uno specifico set di dati sperimentali.

In conclusione della sessione risultati, in Figura R-24, è rappresentato il potenziale d'azione del nuovo modello medio ottenuto, con le principali correnti ioniche che vi contribuiscono.

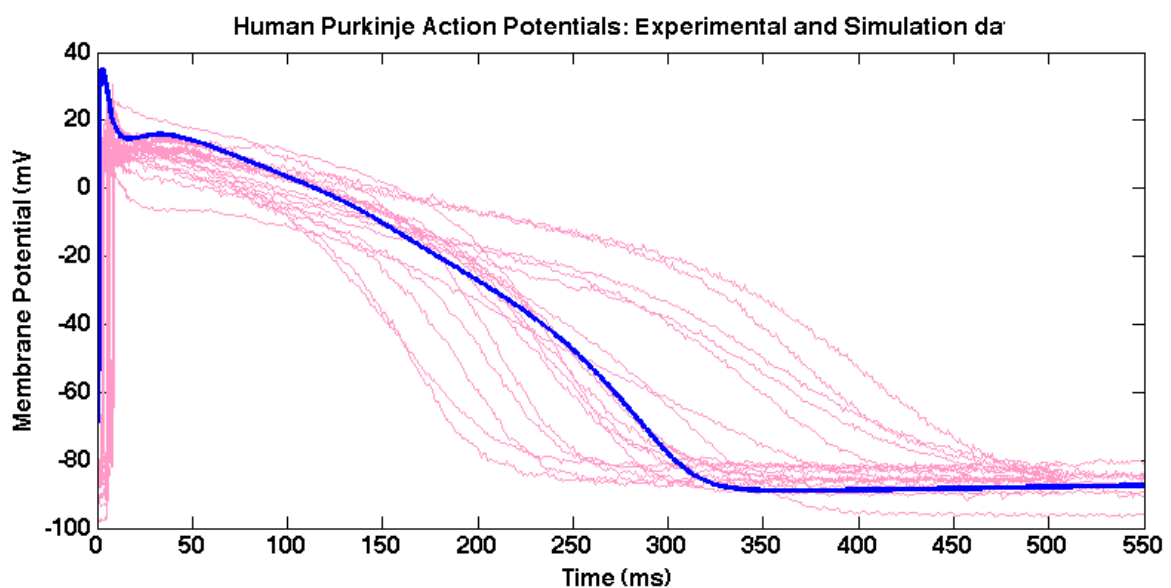


Figura R.26. Confronto tra il Potenziale d'azione simulato dal modello medio umano di Purkinje cardiaco (in blu) e le tracce sperimentali del PA (in rosa) registrato su campioni multicellulari umani di Purkinje cardiaco in current-clamp.

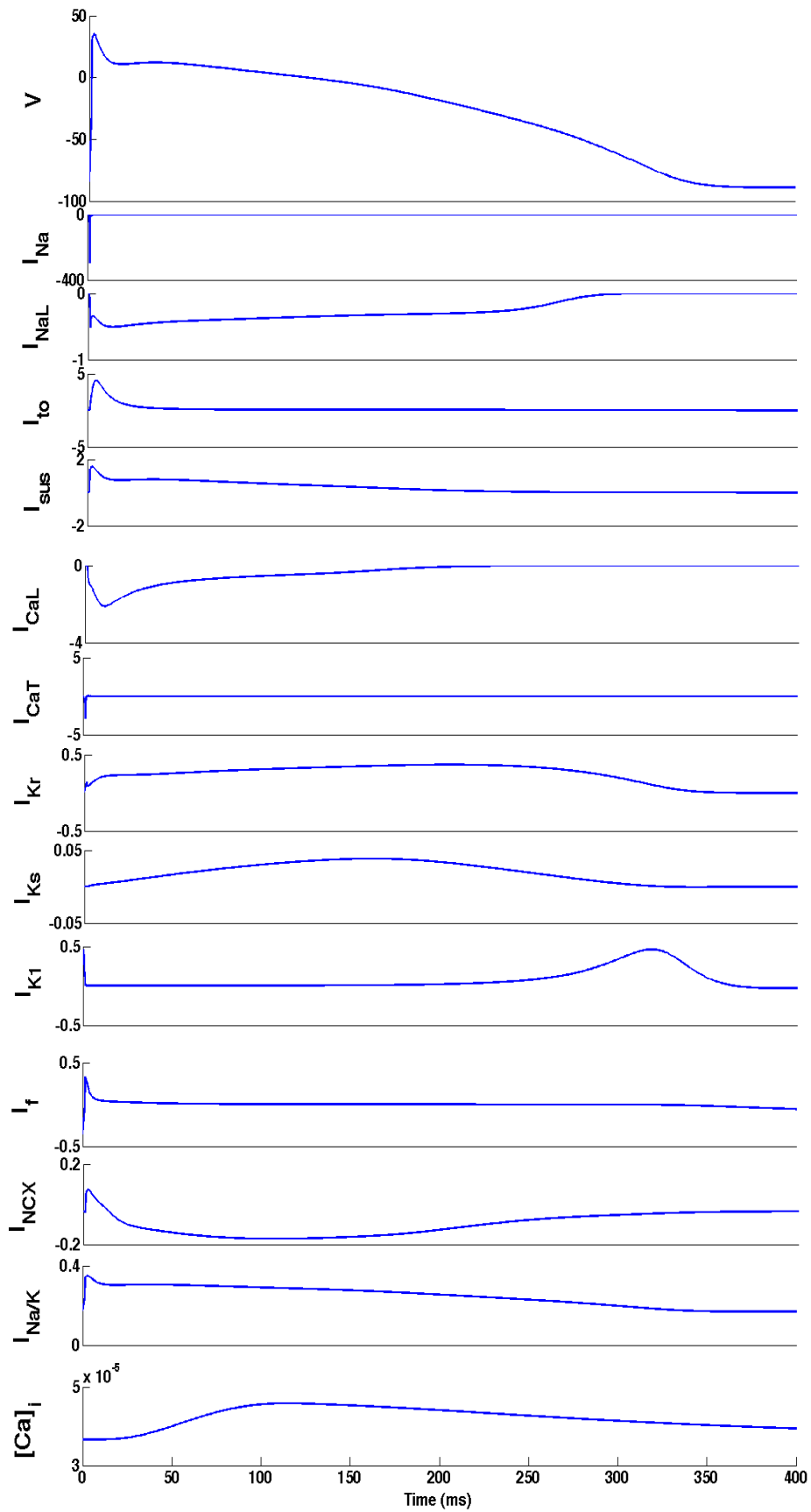


Figura R-27. Potenziale d'azione (mV), correnti (pA/pF) e concentrazione del calcio intracellulare (μM) simulate dal modello medio umano di Purkinje cardiaco.

Conclusioni

Il lavoro presentato in questa Tesi è stato finalizzato alla progettazione di un nuovo modello computazionale del potenziale d'azione di una singola cellula umana di Purkinje. Il modello, implementato in ambiente Matlab, è stato ottenuto a valle di un processo di modellizzazione articolato su più fasi, basato su un innovativo approccio alla modellazione cellulare sviluppato recentemente presso il *Dipartimento di Computer Science* dell'Università di Oxford: le popolazioni di modelli.

Inizialmente è stato costruito il *modello di base*, basato sulla formulazione dell'attuale *gold standard* dei modelli cellulari cardiaci, ovvero il modello ventricolare umano sviluppato da *T. O'Hara* e *Y. Rudy* nel 2011, integrato con la compartimentazione cellulare del modello di cellula canina del Purkinje di *P. Li* e *Y. Rudy* del 2012. Tale formulazione matematica è stata poi modificata sulla base dei dati elettrofisiologici disponibili in letteratura, riferiti a campioni sperimentali di cellule del Purkinje cardiaco umani. In particolare sono state modificate le formulazioni di alcune correnti ioniche: I_{to} , I_{sus} , I_{K1} , I_f .

Il modello di potenziale d'azione risultante, possiede quindi 19 correnti ioniche, 3 compartimenti intracellulari più il reticolo sarcoplasmatico, a sua volta suddiviso in 3 compartimenti interconnessi. Tale modello riproduce le dinamiche intracellulari, per tutti i compartimenti, delle concentrazioni di Na^+ , K^+ , Ca^+ e consta di 41 variabili di stato, a differenza dei due più recenti modelli di Purkinje umano disponibili in letteratura, il modello di Stewart e quello di Sampson, che ne possiedono, rispettivamente, 21 e 84.

Il modello così ottenuto è stato utilizzato come modello di base per la costruzione di una popolazione di 3000 modelli, volta a raffinare i valori delle conduttanze ioniche, per rappresentare al meglio un vasto set di dati sperimentali umani forniti dal gruppo di ricerca del Dipartimento di Farmacologia dell'Università di Szeged (Hungary).

In particolare, sono stati considerati 7 biomarker calcolati a partire dalle tracce dei potenziali d'azione di cellule umane, per filtrare la popolazione di modelli iniziale e mantenere soltanto quelli in linea con i dati sperimentali considerati.

Da questi modelli, è stato ottenuto un nuovo modello medio, che ben riproduce le caratteristiche delle cellule umane del Purkinje cardiaco e i dati sperimentali, e che verrà utilizzato in seguito nell'ambito del mio progetto di Dottorato presso il Dipartimento di Computer Science dell'Università di Oxford, volto ad investigare il ruolo delle fibre cardiache di Purkinje nella genesi di aritmie cardiache.

Come conclusione generale, questa tesi ha dimostrato ancora una volta la validità dell'approccio modellistico "popolazioni di modelli", che può essere applicato a diversi tipi cellulari, per la definizione dei parametri di un modello medio attraverso l'inclusione della variabilità presente nei dati sperimentali, normalmente ignorata dalle tecniche di modellazione classica.

Inoltre, si è messo in evidenza il grado di maturità raggiunto dalla modellizzazione computazionale cardiaca, che in oltre 50 anni di evoluzione, è in grado di fornire strumenti *in silico* per la riproduzione e comprensione dei meccanismi ionici che agiscono a livello cellulare in condizioni fisiologiche e patologiche.

Infine, tali strumenti stanno riscontrando proprio in questo periodo un forte interesse sia tra le Istituzioni Sanitarie e gli enti Regolatori sia delle industrie farmaceutiche, in quanto rappresentano un promettente, economico ed efficiente supporto nelle complesse procedure di valutazione dell'efficacia e della sicurezza delle terapie farmacologiche.

Bibliografia

- Bers, Donald M. (1993). "Excitation-contraction coupling." Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Springer Netherlands. 119-148.
- Aslanidi, O. V., Sleiman, R. N., Boyett, M. R., Hancox, J. C., & Zhang, H. (2010). Ionic mechanisms for electrical heterogeneity between rabbit purkinje fiber and ventricular cells. *Biophysical Journal*, 98(11), 2420–2431.
<http://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.02.033>
- Boyden, P. A., Hirose, M., & Dun, W. (2010). Cardiac Purkinje cells. *Heart Rhythm*, 7(1), 127–135. <http://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.09.017>
- Britton, O. J., Bueno-Orovio, A., Van Ammel, K., Lu, H. R., Towart, R., Gallacher, D. J., & Rodriguez, B. (2013). Experimentally calibrated population of models predicts and explains intersubject variability in cardiac cellular electrophysiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(23), E2098–E2105.
<http://doi.org/10.1073/pnas.1304382110>
- DiFrancesco, D., & Noble, D. (1985). A Model of Cardiac Electrical Activity Incorporating Ionic Pumps and Concentration Changes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 307(1133), 353–398.
<http://doi.org/10.1098/rstb.1985.0001>
- Dobrzynski, H., Anderson, R. H., Atkinson, A., Borbas, Z., Souza, A. D., Fraser, J. F., ... Boyett, M. R. (2013). Pharmacology & Therapeutics Structure , function and clinical relevance of the cardiac conduction system , including the atrioventricular ring and out flow tract tissues. *Pharmacology and Therapeutics*, 139(2), 260–288. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.010>
- Dun, W., & Boyden, P. A. (2008a). The Purkinje cell; 2008 style. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45(5), 617–624.
<http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.08.001>
- Dun, W., & Boyden, P. A. (2008b). The Purkinje cell; 2008 style. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45(5), 617–624.
<http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.08.001>
- Fine, S., Singer, Y., & Tishby, N. (1998). The hierarchical hidden Markov model: Analysis and applications. *Machine Learning*, 32, 41–62.
<http://doi.org/10.1023/A:1007469218079>
- Gaborit, N., Le Bouter, S., Szuts, V., Varro, A., Escande, D., Nattel, S., & Demolombe, S.

- (2007). Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *The Journal of Physiology*, 582(Pt 2), 675–693. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.126714>
- Han, W., Chartier, D., Li, D., & Nattel, S. (2001). Ionic Remodeling of Cardiac Purkinje Cells by Congestive Heart Failure. *Circulation*, 104(17), 2095–2100. <http://doi.org/10.1161/hc4201.097134>
- Han, W., Zhang, L., Schram, G., & Nattel, S. (2002). Properties of potassium currents in Purkinje cells of failing human hearts. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 283(6 52-6), H2495–H2503. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00389.2002>
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, 117, 500–544. <http://doi.org/10.1007/BF02459568>
- Hund, T. J., & Rudy, Y. (2004). Rate dependence and regulation of action potential and calcium transient in a canine cardiac ventricular cell model. *Circulation*, 110(20), 3168–3174. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000147231.69595.D3>
- Iyer, V., Roman-Campos, D., Sampson, K. J., Kang, G., Fishman, G. I., & Kass, R. S. (2015). Purkinje Cells as Sources of Arrhythmias in Long QT Syndrome Type 3. *Scientific Reports*, 5, 13287. <http://doi.org/10.1038/srep13287>
- Jay, V. (1999). A portrait in history: The extraordinary international career of Dr Purkinje. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 123(8), 662.
- Li, P., & Rudy, Y. (2011). A Model of Canine Purkinje Cell Electrophysiology and Ca²⁺ Cycling: Rate Dependence, Triggered Activity, and Comparison to Ventricular Myocytes. *Circulation Research*, 109(1), 71–79. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246512>
- Maruyama, M., Joung, B., Tang, L., Shinohara, T., On, Y.-K., Han, S., ... Chen, P.-S. (2010). Diastolic Intracellular Calcium-Membrane Voltage Coupling Gain and Postshock Arrhythmias: Role of Purkinje Fibers and Triggered Activity. *Circulation Research*, 106(2), 399–408. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.211292>
- McAllister, R. E., Noble, D., & Tsien, R. W. (1975). Reconstruction of the electrical activity of cardiac Purkinje fibres. *The Journal of Physiology*, 251(1), 1–59. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.1975.sp011080>
- Muszkiewicz, A., Britton, O. J., Gemmell, P. M., Passini, E., Sánchez, C., Zhou, X., ... Rodríguez, B. (2015). Variability in cardiac electrophysiology: Using experimentally-calibrated populations of models to move beyond the single virtual physiological human paradigm. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1–13. <http://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.12.002>
- Nagy, N., Szél, T., Jost, N., Tóth, A., Gy Papp, J., & Varró, A. (2015). Novel experimental results in human cardiac electrophysiology: measurement of the

- Purkinje fibre action potential from the undiseased human heart. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 810(May), 1–8.
<http://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0532>
- Noble, D. (1962). A modification of the Hodgkin–Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pace-maker potentials. *The Journal of Physiology*, 160(21), 317–352. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006849>
- O’Hara, T., Virág, L., Varró, A., & Rudy, Y. (2011). Simulation of the Undiseased Human Cardiac Ventricular Action Potential: Model Formulation and Experimental Validation. *PLoS Computational Biology*, 7(5), e1002061.
<http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002061>
- Ono, N., Yamaguchi, T., Ishikawa, H., Arakawa, M., Takahashi, N., Saikawa, T., & Shimada, T. (2009). Morphological varieties of the Purkinje fiber network in mammalian hearts, as revealed by light and electron microscopy. *Archives of Histology and Cytology*, 72(3), 139–49. <http://doi.org/10.1679/aohc.72.139>
- Passini, E. (2015). Computational Modelling of Cardiac Electrophysiology : from Cell to Bedside, Tesi di Dottorato, in .
- Passini, E., Mincholé, A., Coppini, R., Cerbai, E., Rodriguez, B., Severi, S., & Bueno-Orovio, A. (2015). Mechanisms of pro-arrhythmic abnormalities in ventricular repolarisation and anti-arrhythmic therapies in human hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*.
<http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.09.003>
- Sampson, K. J., Iyer, V., Marks, a. R., & Kass, R. S. (2010). A computational model of Purkinje fibre single cell electrophysiology: implications for the long QT syndrome. *The Journal of Physiology*, 588(14), 2643–2655.
<http://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.187328>
- Sebastian, R., Zimmerman, V., Romero, D., Sanchez-Quintana, D., & Frangi, A. F. (2013). Characterization and modeling of the peripheral cardiac conduction system. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 32(1), 45–55.
<http://doi.org/10.1109/TMI.2012.2221474>
- Silverthorn, Dee Unglaub, et al. *Fisiologia umana: un approccio integrato*. Vol. 281991312. Pearson, 2010.
- Stewart, P., Aslanidi, O. V., Noble, D., Noble, P. J., Boyett, M. R., & Zhang, H. (2009). Mathematical models of the electrical action potential of Purkinje fibre cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 367(1896), 2225–2255.
<http://doi.org/10.1098/rsta.2008.0283>
- ten Tusscher, K. H. W. J., Noble, D., Noble, P. J., & Panfilov, A. V. (2004). A model for human ventricular tissue. *AJP - Heart and Circulatory Physiology*, 286(4), H1573–H1589. Retrieved from

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/abstract/286/4/H1573>

ten Tusscher, K. H. W. J., & Panfilov, A. V. (2006). Alternans and spiral breakup in a human ventricular tissue model. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 291(3), H1088–H1100.

<http://doi.org/10.1152/ajpheart.00109.2006>

Tusscher, K. H. W. J. T., & Panfilov, A. V. (2008). Modelling of the ventricular conduction system. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 96(1-3), 152–170. <http://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2007.07.026>

Vigmond, E. J., & Stuyvers, B. D. (2015). Modeling our understanding of the His-Purkinje system. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.12.013>

Walmsley, J., Rodriguez, J. F., Mirams, G. R., Burrage, K., Efimov, I. R., & Rodriguez, B. (2013). mRNA Expression Levels in Failing Human Hearts Predict Cellular Electrophysiological Remodeling: A Population-Based Simulation Study. *PLoS ONE*, 8(2), e56359. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0056359>

Zhang, H., Holden, A. V., Kodama, I., Honjo, H., Lei, M., Varghese, T., & Boyett, M. R. (2000). Mathematical models of action potentials in the periphery and center of the rabbit sinoatrial node. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279(1), H397–421. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899081>

Appendice A: Equazioni e parametri del modello

Basic Parameters

Stimulus

$$\text{Amplitudine } I_{\text{stim}} = -40 \frac{\mu A}{\mu F}$$

$$\text{Duration} = 1 \text{ ms.}$$

Extracellular Concentrations

$$[\text{Na}^+]_o = 140 \text{ mM}$$

$$[\text{Ca}^{2+}]_o = 1.8 \text{ mM}$$

$$[\text{K}^+]_o = 5.4 \text{ mM}$$

Cell Geometry

$$L = 0.0164 \text{ cm}$$

$$r = 0.00175 \text{ cm}$$

$$v_{\text{cell}} = \pi \cdot r^2 \cdot L = 16 \cdot 10^{-5} \mu L$$

$$A_{\text{geo}} = 2\pi \cdot r^2 + 2\pi \cdot r \cdot L = 2 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$$

$$A_{\text{cap}} = 2 \cdot A_{\text{geo}} = 4 \cdot 10^{-4} \mu L$$

$$v_{\text{myo}} = 0.6 \cdot v_{\text{cell}} = 9.5 \cdot 10^{-5} \mu L$$

$$v_{\text{nsr}} = 0.04 \cdot v_{\text{cell}} = 6.3 \cdot 10^{-6} \mu L$$

$$v_{\text{ss}} = 0.02 \cdot v_{\text{cell}} = 3.1 \cdot 10^{-6} \mu L$$

$$v_{\text{jsr}} = 0.002 \cdot v_{\text{cell}} = 3.1 \cdot 10^{-7} \mu L$$

$$v_{\text{sl}} = 0.15 \cdot v_{\text{cell}} = 2.4 \cdot 10^{-5} \mu L$$

$$v_{\text{csr}} = 0.008 \cdot v_{\text{cell}} = 1.3 \cdot 10^{-6} \mu L$$

Model current equations

Voltage

$$C_m \frac{dV}{dt} = -(I_{\text{ion}} + I_{\text{stim}})$$

$$I_{\text{ion}} = I_{\text{Na}} + I_{\text{NaL}} + I_{\text{to}} + I_{\text{sus}} + I_{\text{CaL}} + I_{\text{caT}} + I_{\text{CaNa}} + I_{\text{CaK}} + I_{\text{Kr}} + I_{\text{Ks}} + I_{\text{f}} + I_{\text{K1}} + I_{\text{NaCa}} \\ + I_{\text{NaK}} + I_{\text{Nab}} + I_{\text{Cab}} + I_{\text{Kb}} + I_{\text{pCa}} + I_{\text{Stim}}$$

Fast-Sodium Current (I_{Na})

$$g_{\text{Na,fast}} = 97.5 \text{ mS}/\mu\text{F}$$

$$m_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{-\left(\frac{V+39.57}{9.871}\right)}}$$

$$\tau_m = \frac{1}{6.755 \cdot e^{\left(\frac{V+11.64}{34.77}\right)} + 8.552 \cdot e^{-\left(\frac{V+77.42}{5.955}\right)}}$$

$$h_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{V+82.9}{6.086}\right)}}$$

$$\tau_{\text{h,fast}} = \frac{1}{1.432 \cdot 10^{-5} \cdot e^{-\left(\frac{V+1.196}{6.285}\right)} + 6.149 \cdot e^{\left(\frac{V+0.5096}{20.27}\right)}}$$

$$\tau_{\text{h,slow}} = \frac{1}{0.009764 \cdot e^{-\left(\frac{V+17.95}{28.05}\right)} + 0.3343 \cdot e^{\left(\frac{V+5.730}{5.955}\right)}}$$

$$A_{\text{h,fast}} = 0.99, \quad A_{\text{h,slow}} = 0.01$$

$$h = A_{\text{h,fast}} \cdot h_{\text{fast}} + A_{\text{h,slow}} \cdot h_{\text{slow}}$$

$$j_{\infty} = h_{\infty}$$

$$\tau_j = 2.038 + \frac{1}{0.02136 \cdot e^{-\left(\frac{V+100.6}{8.281}\right)} + 0.3052 \cdot e^{\left(\frac{V+0.9941}{38.45}\right)}}$$

$$h_{\text{CaMK},\infty} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{V+89.1}{6.086}\right)}}$$

$$\tau_{h,\text{CaMK,slow}} = 3 \cdot \tau_{h,\text{slow}}$$

$$A_{h,\text{CaMK,fast}} = A_{h,\text{fast}}$$

$$A_{h,\text{CaMK,slow}} = A_{h,\text{slow}}$$

$$h_{\text{CaMK},\infty} = h_{\text{fast}}$$

$$h_{\text{CaMK}} = A_{h,\text{CaMK,fast}} \cdot h_{\text{CaMK,fast}} + A_{h,\text{CaMK,slow}} \cdot h_{\text{CaMK,slow}}$$

$$j_{\text{CaMK},\infty} = j_{\infty}$$

$$\tau_{j,\text{CaMK}} = 1.46 \cdot \tau_j$$

$$K_{m,\text{CaMK}} = 0.15, \quad \phi_{\text{INa,CaMK}} = \frac{1}{1 + \frac{K_{m,\text{CaMK}}}{K_{m,\text{CaMK,active}}}}$$

$$I_{\text{Na,fast}} = g_{\text{Na,fast}} \cdot (V - E_{\text{Na}}) \cdot m^3 \cdot ((1 - \phi_{\text{INa,CaMK}}) \cdot h \cdot j + \phi_{\text{INa,CaMK}} \cdot h_{\text{CaMK}} \cdot j_{\text{CaMK}})$$

Late-Sodium Current ($I_{\text{Na,L}}$)

$$g_{\text{Na,late}} = 0.0195 \text{ mS}/\mu\text{F}$$

$$m_{\text{L},\infty} = \frac{1}{1 + e^{-\left(\frac{V+42.85}{5.264}\right)}}$$

$$\tau_{m,\text{L}} = \tau_m$$

$$h_{\text{L},\infty} = \frac{1}{1 + e^{-\left(\frac{V+87.61}{5.264}\right)}}$$

$$\tau_{h,\text{L}} = 200 \text{ ms}$$

$$h_{\text{L,CaMK},\infty} = \frac{1}{1 + e^{-\left(\frac{V+93.81}{7.488}\right)}}$$

$$\tau_{h,\text{LCaMK}} = 3 \cdot \tau_{h,\text{L}}$$

$$K_{m,\text{CaMK}} = 0.15, \quad \phi_{\text{INaL,CaMK}} = \frac{1}{1 + \frac{K_{m,\text{CaMK}}}{K_{m,\text{CaMK,active}}}}$$

$$I_{\text{Na,late}} = g_{\text{Na,late}} \cdot (V - E_{\text{Na}}) \cdot m_{\text{L}} \cdot ((1 - \phi_{\text{INaL,CaMK}}) \cdot h_{\text{L}} + \phi_{\text{INaL,CaMK}} \cdot h_{\text{L,CaMK}})$$

L-type Calcium Current (I_{CaL})

$$d = \frac{1}{1 + e^{-\left(\frac{V+3.94}{4.23}\right)}}$$

$$\tau_d = 0.6 + \frac{1}{e^{-0.05 \cdot (V+6)} + e^{-0.09 \cdot (V+14)}}$$

$$f_\infty = \frac{1}{1 + e^{-\left(\frac{V+19.58}{3.696}\right)}}$$

$$\tau_{f,fast} = 7 + \frac{1}{0.0045 \cdot e^{-\left(\frac{V+20}{10}\right)} + 0.0045 \cdot e^{\left(\frac{V+20}{10}\right)}}$$

$$\tau_{f,slow} = 1000 + \frac{1}{0.000035 \cdot e^{-\left(\frac{V+5}{4}\right)} + 0.000035 \cdot e^{\left(\frac{V+5}{4}\right)}}$$

$$A_{f,fast} = 0.6, \quad A_{f,slow} = 1 - A_{f,fast}$$

$$f = A_{f,fast} \cdot f_{fast} + A_{f,slow} \cdot f_{slow}$$

$$f_{Ca,\infty} = f_\infty$$

$$\tau_{f,Ca,fast} = 7 + \frac{1}{0.04 \cdot e^{-\left(\frac{V+4}{7}\right)} + 0.04 \cdot e^{\left(\frac{V-4}{7}\right)}}$$

$$\tau_{f,Ca,slow} = 100 + \frac{1}{0.00012 \cdot e^{-\left(\frac{V}{3}\right)} + 0.00012 \cdot e^{\left(\frac{V}{3}\right)}}$$

$$A_{f,Ca,fast} = 0.3 + \frac{0.6}{1 + e^{-\left(\frac{V-10}{10}\right)}}, \quad A_{f,Ca,slow} = 1 - A_{f,Ca,fast}$$

$$f_{Ca} = A_{f,Ca,fast} \cdot f_{Ca,fast} + A_{f,Ca,slow} \cdot f_{Ca,slow}$$

$$j_{Ca,\infty} = f_{Ca,\infty}$$

$$\tau_{j,Ca} = 75$$

$$f_{CaMK,\infty} = f_\infty$$

$$\tau_{f,CaMK,fast} = 2.5 \cdot \tau_{f,fast}$$

$$A_{f,CaMK,fast} = A_{f,fast}, \quad A_{f,CaMK,slow} = A_{f,slow}$$

$$f_{CaMK,slow} = f_{slow}$$

$$f_{CaMK} = A_{f,CaMK,fast} \cdot f_{CaMK,fast} + A_{f,CaMK,slow} \cdot f_{CaMK,slow}$$

$$f_{Ca,CaMK,\infty} = f_\infty$$

$$\tau_{f,Ca,CaMK,fast} = 2.5 \cdot \tau_{f,Ca,fast}$$

$$A_{f,Ca,CaMK,fast} = A_{f,Ca,fast},$$

$$A_{f,Ca,CaMK,slow} = A_{f,Ca,slow}$$

$$f_{Ca,CaMK,slow} = f_{Ca,slow}$$

$$f_{Ca,CaMK} = A_{f,Ca,CaMK,fast} \cdot f_{Ca,CaMK,fast} + A_{f,Ca,CaMK,slow} \cdot f_{Ca,CaMK,slow}$$

$$K_{m,n} = 0.002, \quad K_{+2,n} = 1000, \quad K_{-2,n} = j_{Ca}$$

$$\alpha_n = \frac{1}{\frac{K_{+2,n}}{K_{-2,n}} + \left(1 + e^{\left(\frac{K_{m,n}}{[Ca^{2+}]_{sl}}\right)}\right)^4}$$

$$P_{Ca} = 0.0001 \frac{cm}{s}$$

$$\gamma_{Cai} = 1, \quad \gamma_{Cao} = 0.341, \quad z_{Ca} = 2$$

$$\Psi_{Ca} = z_{Ca}^2 \cdot \frac{VF^2}{RT} \cdot \frac{\gamma_{Cai} \cdot [Ca^{2+}]_{ss} \cdot \exp\left(\frac{z_{Ca}VF}{RT}\right) - \gamma_{Cao} \cdot [Ca^{2+}]_o}{\exp\left(\frac{z_{Ca}VF}{RT}\right) - 1.0}$$

$$\overline{I_{CaL}} = P_{Ca} \cdot \Psi_{Ca}$$

$$P_{CaNa} = 0.00125 \cdot P_{Ca}, \quad \gamma_{Nai} = 0.75, \quad \gamma_{Nao} = 0.75, \quad z_{Na} = 1$$

$$\Psi_{CaNa} = z_{Na}^2 \cdot \frac{VF^2}{RT} \cdot \frac{\gamma_{Nai} \cdot [Na^+]_{ss} \cdot \exp\left(\frac{z_{Na}VF}{RT}\right) - \gamma_{Nao} \cdot [Na^+]_o}{\exp\left(\frac{z_{Na}VF}{RT}\right) - 1.0}$$

$$\overline{I_{CaNa}} = P_{CaNa} \cdot \Psi_{CaNa}$$

$$P_{CaK} = 3.574 \cdot 10^{-4} \cdot P_{Ca}, \quad \gamma_{Ki} = 0.75, \quad \gamma_{Ko} = 0.75, \quad z_K = 1$$

$$\Psi_{CaK} = z_K^2 \cdot \frac{VF^2}{RT} \cdot \frac{\gamma_{Ki} \cdot [K^+]_{ss} \cdot \exp\left(\frac{z_KVF}{RT}\right) - \gamma_{Ko} \cdot [K^+]_o}{\exp\left(\frac{z_KVF}{RT}\right) - 1.0}$$

$$\overline{I_{CaK}} = P_{CaK} \cdot \Psi_{CaK}$$

$$P_{Ca,CaMK} = 1.1 \cdot P_{Ca}$$

$$\overline{I_{CaL,CaMK}} = P_{Ca,CaMK} \cdot \Psi_{Ca}$$

$$P_{CaNa,CaMK} = 0.00125 \cdot P_{Ca,CaMK}$$

$$\overline{I_{CaNa,CaMK}} = P_{CaNa,CaMK} \cdot \Psi_{CaNa}$$

$$P_{CaK,CaMK} = 3.574 \cdot 10^{-4} \cdot P_{Ca,CaMK}$$

$$\overline{I_{CaK,CaMK}} = P_{CaK,CaMK} \cdot \Psi_{CaK}$$

$$K_{m,CaMK} = 0.15, \quad \phi_{ICaL,CaMK} = \frac{1}{1 + \frac{K_{m,CaMK}}{CaMK_{active}}}$$

$$I_{CaL} = \overline{I_{CaL}} \cdot d \cdot (1 - \phi_{ICaL,CaMK}) \cdot (f \cdot (1 - n) + f_{Ca} \cdot n \cdot j_{Ca}) + \overline{I_{CaL,CaMK}} \cdot d \cdot \phi_{ICaL,CaMK} \cdot (f_{CaMK} \cdot (1 - n) + f_{Ca,CaMK} \cdot n \cdot j_{Ca})$$

$$I_{CaNa} = \overline{I_{CaNa}} \cdot d \cdot (1 - \phi_{ICaL,CaMK}) \cdot (f \cdot (1 - n) + f_{Ca} \cdot n \cdot j_{Ca}) + \overline{I_{CaNa,CaMK}} \cdot d \cdot \phi_{ICaL,CaMK} \cdot (f_{CaMK} \cdot (1 - n) + f_{Ca,CaMK} \cdot n \cdot j_{Ca})$$

$$I_{CaK} = \overline{I_{CaK}} \cdot d \cdot (1 - \phi_{ICaL,CaMK}) \cdot (f \cdot (1 - n) + f_{Ca} \cdot n \cdot j_{Ca}) + \overline{I_{CaK,CaMK}} \cdot d \cdot \phi_{ICaL,CaMK} \cdot (f_{CaMK} \cdot (1 - n) + f_{Ca,CaMK} \cdot n \cdot j_{Ca})$$

T-type Calcium Current (I_{CaT})

$$g_{CaT} = 0.07875 \text{ mS}/\mu F$$

$$b_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{-\left(\frac{V+30}{7}\right)}}$$

$$\tau_b = \frac{1}{1.068 \cdot e^{-\left(\frac{V-16.3}{30}\right)} + 1.068 \cdot e^{\left(\frac{V-16.3}{30}\right)}}$$

$$g_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{V+61}{5}\right)}}$$

$$\tau_b = \frac{1}{0.015 \cdot e^{-\left(\frac{V-71.7}{83}\right)} + 0.015 \cdot e^{\left(\frac{V+71.7}{15.4}\right)}}$$

$$I_{CaT} = g_{Ca,T} \cdot b \cdot g \cdot (V - E_{Ca})$$

Transient Outward Current (I_{to})

$$g_{to} = 0.2755 \text{ mS}/\mu F$$

$$a_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{20-V}{13}\right)}}$$

$$\tau_a = 10.45 \cdot e^{-\left(\frac{(V+40)^2}{1800}\right)} + 7.3$$

$$i_{1,\infty} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{V+27}{13}\right)}}$$

$$i_{1,\infty} = i_{2,\infty}$$

$$\tau_{i1} = 85 \cdot e^{-\left(\frac{(V+25)^2}{320}\right)} + \frac{5}{1 + e^{\left(\frac{V-40}{5}\right)}} + 42$$

$$\tau_{i2} = 37 \cdot e^{-\left(\frac{(V+81)^2}{197}\right)} + \frac{5.36}{1 + e^{\left(\frac{V-18}{7}\right)}} + 6.3$$

$$I_{to} = g_{to} \cdot r \cdot g \cdot (V - E_k)$$

Sustained Potassium Current (I_{sus})

$$g_{\text{sus}} = 0.0235 \text{ mS}/\mu\text{F}$$

$$a_{\text{sus}} = \frac{1}{1 + e^{-\left(\frac{V-12}{16}\right)}}$$

$$i_{\text{sus}} = g_{\text{sus}} \cdot a_{\text{sus}} \cdot (V - E_{\text{K}})$$

Rapid Delayed Rectifier Potassium Current (I_{Kr})

$$g_{\text{Kr}} = 0.046 \text{ mS}/\mu\text{F}$$

$$x_{\text{r}\infty} = \frac{1}{1 + e^{-\left(\frac{V+8.337}{6.789}\right)}}$$

$$\tau_{\text{xr,fast}} = 12.98 + \frac{1}{0.3652 \cdot e^{\left(\frac{V-31.66}{3.869}\right)} + 4.123 \cdot 10^{-5} \cdot e^{-\left(\frac{V-47.78}{20.38}\right)}}$$

$$\tau_{\text{xr,slow}} = 1.865 + \frac{1}{0.06629 \cdot e^{\left(\frac{V-34.70}{7.355}\right)} + 1.128 \cdot 10^{-5} \cdot e^{-\left(\frac{V-29.74}{25.94}\right)}}$$

$$A_{\text{xr,fast}} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{V+54.81}{38.21}\right)}},$$

$$A_{\text{xr,slow}} = 1 - A_{\text{xr,fast}}$$

$$x_{\text{r}} = A_{\text{xr,fast}} \cdot x_{\text{r,fast}} + A_{\text{xr,slow}} \cdot x_{\text{r,slow}}$$

$$R_{\text{Kr}} = \frac{1}{\left(1 + e^{\left(\frac{V+55}{75}\right)}\right) \cdot \left(1 + e^{\left(\frac{V-10}{30}\right)}\right)}$$

$$i_{\text{Kr}} = g_{\text{Kr}} \cdot \sqrt{\frac{[\text{K}^+]_0}{5.4}} \cdot x_{\text{r}} \cdot R_{\text{Kr}} \cdot (V - E_{\text{K}})$$

Slow Delayed Rectifier Potassium Current (I_{Ks})

$$g_{\text{Kr}} = 0.0034 \text{ mS}/\mu\text{F}$$

$$x_{\text{s1},\infty} = \frac{1}{1 + e^{-\left(\frac{V+11.6}{8.932}\right)}}$$

$$\tau_{x,s1} = 817.3 + \frac{1}{0.001292 \cdot e^{-\left(\frac{V+210}{230}\right)} + 2.326 \cdot 10^{-4} \cdot e^{\left(\frac{V+48.28}{17.8}\right)}}$$

$$x_{s2,\infty} = x_{s1,\infty}$$

$$\tau_{x,s2} = \frac{1}{0.01 \cdot e^{\left(\frac{V-50}{20}\right)} + 0.0193 \cdot e^{-\left(\frac{V+66.54}{31}\right)}}$$

$$i_{Ks} = g_{Ks} \cdot \left(1 + \frac{0.6}{1 + \left(\frac{3.8 \cdot 10^{-5}}{[Ca^{2+}]_{sl}} \right)^{1.4}} \right) \cdot x_{s1} \cdot x_{s2} \cdot (V - E_{Ks})$$

Inward Rectifier Potassium Current (I_{K1})

$$g_{K1} = 0.1267 \cdot \sqrt{\frac{[K^+]_o}{5.4}} \text{ mS}/\mu F$$

$$x_{K1,\infty} = \frac{1}{1 + e^{-\left(\frac{V+2.5538 \cdot [K^+]_o + 144.59}{1.5692 \cdot [K^+]_o + 3.8115}\right)}}$$

$$\tau_{x,K1} = \frac{122.2}{e^{-\left(\frac{V+127.2}{20.36}\right)} + e^{\left(\frac{V+236.8}{69.33}\right)}}$$

$$R_{K1} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{V+105.8-2.6 \cdot [K^+]_o}{9.493}\right)}}$$

$$i_{K1} = g_{K1} \cdot x_{K1} \cdot R_{K1} \cdot (V - E_K)$$

Hyperpolarization-activated Current (I_f)

$$g_{f,K} = 0.0234 \text{ mS}/\mu F$$

$$g_{f,Na} = 0.0146 \text{ mS}/\mu F$$

$$y_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{V+80.6}{6.8}\right)}}$$

$$\alpha_y = e^{-2.9-(0.04V)}$$

$$\beta_y = e^{3.6+(0.04V)}$$

$$\tau_y = \frac{4000}{\alpha_y + \beta_y}$$

$$i_{f,K} = g_{f,K} \cdot y \cdot (V - E_K)$$

$$i_{f,Na} = g_{f,Na} \cdot y \cdot (V - E_{Na})$$

$$i_f = i_{f,K} + i_{f,Na}$$

Sodium-Calcium Exchange Current (I_{NaCa})

For, $Y \in \{i, ss\}$

$$k_{Na1} = 15 \text{ mM}, \quad k_{Na2} = 5 \text{ mM}, \quad k_{Na3} = 88.12 \text{ mM}, \quad k_{asymm} = 12.5$$

$$\omega_{Na} = 6 \cdot 10^4 \text{ Hz}, \quad \omega_{Ca} = 6 \cdot 10^4 \text{ Hz}, \quad \omega_{NaCa} = 5 \cdot 10^3 \text{ Hz}$$

$$k_{Ca,on} = 1.5 \cdot 10^6 \frac{\text{mM}}{\text{ms}}, \quad k_{Ca,off} = 5 \cdot 10^3 \text{ Hz}$$

$$q_{Na} = 0.5224, \quad q_{Ca} = 0.1670$$

$$h_{Ca} = \exp\left(\frac{q_{Ca}VF}{RT}\right), \quad h_{Na} = \exp\left(\frac{q_{Na}VF}{RT}\right)$$

$$h_1 = 1 + \frac{[Na^+]_Y}{k_{Na3}} (1 + h_{Na})$$

$$h_2 = \frac{[Na^+]_Y \cdot h_{Na}}{k_{Na3} \cdot h_1}$$

$$h_3 = \frac{1}{h_1}$$

$$h_4 = 1 + \frac{[Na^+]_Y}{k_{Na1}} \left(1 + \frac{[Na^+]_Y}{k_{Na2}}\right)$$

$$h_5 = \frac{[Na^+]_Y^2}{h_4 \cdot k_{Na1} \cdot k_{Na2}}$$

$$h_6 = \frac{1}{h_4}$$

$$h_7 = 1 + \frac{[Na^+]_o}{k_{Na3}} \left(1 + \frac{1}{h_{Na}}\right)$$

$$h_8 = \frac{[Na^+]_o}{k_{Na3} \cdot h_{Na} \cdot h_7}$$

$$\begin{aligned}
h_9 &= \frac{1}{h_7} \\
h_{10} &= k_{\text{asymm}} + 1 + \frac{[\text{Na}^+]_o}{k_{\text{Na1}}} \left(1 + \frac{[\text{Na}^+]_o}{k_{\text{Na2}}} \right) \\
h_{11} &= \frac{[\text{Na}^+]_o^2}{h_{10} \cdot k_{\text{Na1}} \cdot k_{\text{Na2}}} \\
h_{12} &= \frac{1}{h_{10}} \\
k_1 &= h_{12} \cdot [\text{Ca}^{2+}]_o \cdot k_{\text{Ca,on}} \\
k_2 &= k_{\text{Ca,off}} \\
k'_3 &= h_9 \cdot \omega_{\text{Ca}} \\
k''_3 &= h_8 \cdot \omega_{\text{NaCa}} \\
k_3 &= k'_3 + k''_3 \\
k'_4 &= \frac{h_3 \cdot \omega_{\text{Ca}}}{h_{\text{Ca}}} \\
k''_4 &= h_2 \cdot \omega_{\text{NaCa}} \\
k_4 &= k'_4 + k''_4 \\
k_5 &= k_{\text{Ca,off}} \\
k_6 &= h_6 \cdot [\text{Ca}^{2+}]_Y \cdot k_{\text{Ca,on}} \\
k_7 &= h_5 \cdot h_2 \cdot \omega_{\text{Na}} \\
k_8 &= h_8 \cdot h_{11} \cdot \omega_{\text{Na}} \\
x_1 &= k_2 \cdot k_4 \cdot (k_7 + k_6) + k_5 \cdot k_7 \cdot (k_2 + k_3) \\
x_2 &= k_1 \cdot k_7 \cdot (k_4 + k_5) + k_4 \cdot k_6 \cdot (k_1 + k_8) \\
x_3 &= k_1 \cdot k_3 \cdot (k_7 + k_6) + k_8 \cdot k_6 \cdot (k_2 + k_3) \\
x_4 &= k_2 \cdot k_8 \cdot (k_4 + k_5) + k_3 \cdot k_5 \cdot (k_1 + k_8) \\
E_1 &= \frac{x_1}{x_1 + x_2 + x_3 + x_4} \\
E_2 &= \frac{x_2}{x_1 + x_2 + x_3 + x_4} \\
E_3 &= \frac{x_3}{x_1 + x_2 + x_3 + x_4} \\
E_4 &= \frac{x_4}{x_1 + x_2 + x_3 + x_4} \\
K_{\text{mCaAct}} &= 150 \cdot 10^{-6} \text{ mM} \\
\text{allo}_Y &= \frac{1}{1 + \left(\frac{K_{\text{mCaAct}}}{[\text{Ca}^{2+}]_Y} \right)^2} \\
J_{\text{NaCa,Na,Y}} &= 3 \cdot (E_4 \cdot k_7 - E_1 \cdot k_8) + E_3 \cdot k'_4 - E_2 \cdot k''_3 \\
J_{\text{NaCa,Ca,Y}} &= E_2 \cdot k_2 - E_1 \cdot k_1 \\
\frac{z_{\text{Na}}}{G_{\text{NaCa}}} &= 1, \quad z_{\text{Ca}} = 2 \\
\overline{G_{\text{NaCa}}} &= 0.0008 \mu\text{A}/\mu\text{F} \\
I_{\text{NaCa,i}} &= \overline{G_{\text{NaCa}}} \cdot 0.8 \cdot \text{allo}_i \cdot (z_{\text{Na}} \cdot J_{\text{NaCa,Na,i}} + z_{\text{Ca}} \cdot J_{\text{NaCa,Ca,i}}) \\
I_{\text{NaCa,ss}} &= \overline{G_{\text{NaCa}}} \cdot 0.2 \cdot \text{allo}_{\text{ss}} \cdot (z_{\text{Na}} \cdot J_{\text{NaCa,Na,ss}} + z_{\text{Ca}} \cdot J_{\text{NaCa,Ca,ss}}) \\
I_{\text{NaCa}} &= I_{\text{NaCa,i}} + I_{\text{NaCa,ss}}
\end{aligned}$$

Sodium-Potassium ATPase Current (I_{NaK})

$$\begin{aligned} k_1^+ &= 949.5 \text{ Hz}, \quad k_1^- = 182.4 \text{ mM}^{-1}, \quad k_2^+ = 687.2 \text{ Hz}, \quad k_2^- = 39.4 \text{ Hz} \\ k_3^+ &= 1899 \text{ Hz}, \quad k_3^- = 79300 \text{ Hz} \cdot \text{mM}^{-2}, \quad k_4^+ = 639.0 \text{ Hz}, \quad k_4^- = 40 \text{ Hz} \\ K_{Na,i}^0 &= 9.073 \text{ mM}, \quad K_{Na,o}^0 = 27.78 \text{ mM} \\ \Delta &= -0.1550 \end{aligned}$$

$$K_{Na,i} = K_{Na,i}^0 \cdot \exp\left(\frac{\Delta \cdot V \cdot F}{3 \cdot R \cdot T}\right), \quad K_{Na,o} = K_{Na,o}^0 \cdot \exp\left(\frac{(1 - \Delta) \cdot V \cdot F}{3 \cdot R \cdot T}\right)$$

$$K_{K,i} = 0.5 \text{ mM}, \quad K_{K,o} = 0.3582 \text{ mM}$$

$$[MgADP] = 0.05, \quad [MgATP] = 9.8$$

$$K_{MgATP} = 1.698 \cdot 10^{-7} \text{ mM}$$

$$[H^+] = 10^{-7} \text{ mM}$$

$$[\Sigma P] = 4.2 \text{ mM}$$

$$K_{H,P} = 1.698 \cdot 10^{-7} \text{ mM}, \quad K_{Na,P} = 224 \text{ mM}, \quad K_{K,P} = 292 \text{ mM}$$

$$[P] = [\Sigma P] / \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{H,P}} + \frac{[Na^+]_i}{K_{Na,P}} + \frac{[K^+]_i}{K_{K,P}}\right)$$

$$\alpha_1 = \frac{k_1^+ \left(\frac{[Na^+]_i}{K_{Na,i}}\right)^3}{\left(1 + \frac{[Na^+]_i}{K_{Na,i}}\right)^3 + \left(1 + \frac{[K^+]_i}{K_{K,i}}\right)^2 - 1}$$

$$\beta_1 = k_1^- \cdot [MgADP]$$

$$\alpha_2 = k_2^+$$

$$\beta_2 = \frac{k_2^- \left(\frac{[Na^+]_o}{K_{Na,o}}\right)^3}{\left(1 + \frac{[Na^+]_o}{K_{Na,o}}\right)^3 + \left(1 + \frac{[K^+]_o}{K_{K,o}}\right)^2 - 1}$$

$$\alpha_3 = \frac{k_3^+ \left(\frac{[K^+]_o}{K_{K,o}}\right)^2}{\left(1 + \frac{[Na^+]_o}{K_{Na,o}}\right)^3 + \left(1 + \frac{[K^+]_o}{K_{K,o}}\right)^2 - 1}$$

Appendice B: Codice Matlab

```
function output=CrModPj(t,X,varargin)
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Passini-Trovato Human Purkinje Model (2016)
%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Optional Inputs:
% (Default values *)
% 1) flag_ode:
%   - flag_ode=0 -> "computed variables" output
%   - flag_ode=1* -> dX output
%
% 2) pstim: stimulation protocol and parameters
%   - pstim=0;          -> No Stimulation
%   - pstim=1*         -> I-clamp, single beat
%   - pstim=[2 CL]     -> I-clamp, multiple beats with CL as input
%   - pstim=[3 vclamp] -> Ely V-clamp, single V-step
%
% 3) Extracellular Ionic Concentrations [cCao cNao cKo] mM:
%   default values: Cao = 1.8mM*; Nao = 140mM*; cKo = 5.4mM*
%   - if length=1 -> [cCao] only
%   - if length=2 -> [cCao cNao]
%   - if length=3 -> [cCao cNao cKo]
%
% 4) Intracellular Na and K: 1 -> constant, 0 -> not constant
%   cIn_cost=[cNai cKi];
%   default values: cIn_cost=[0 0]*; not constant
%
% 5) Population of model: Variations of N parameters
%   - pop=ones(N)*
%   - pop=vector of N coefficient
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Optional Inputs setting:
% Set default values for optional inputs
cEx0 = [1.8, 140.0, 5.4];
cIn_cost0 =[0 0];
pop0=[0.86 1.09 0.75 0.94 0.87 0.66 0.86 0.97 0.82 0.98 1.37 1.16 0.96
1.1];
optargs = {1,1,cEx0,cIn_cost0,pop0};
% skip any new inputs, if empty
newVals = cellfun(@(x) ~isempty(x), varargin);
% overwrite inputs specified in varargin
optargs(newVals) = varargin(newVals);
% [optargs{1:length(varargin)}] = varargin{:};
[flag_ode, pstim, cEx, cIn_cost,pop]=optargs{:};
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```

%% State Variables
%%Membrane Potential V
v = X(1);
%%Ionic Intracellular Concentrations
nai = X(2);  nass = X(3);
ki = X(4);  kss = X(5);
cai = X(6);  cass = X(7);
cansr = X(8);  cajsr = X(9);
%%INa gv
m = X(10);    hf = X(11);  hs = X(12);
j = X(13);    hsp = X(14);  jp = X(15);
%%INaL gv
mL = X(16);    hL = X(17);  hLp = X(18);
%%Ito gv
a = X(19);
%%ICaL
d = X(25);
ff = X(26);  fs = X(27);  fcac = X(28);  fcas = X(29);
jca = X(30);  nca = X(31);  ffp = X(32);  fcacp = X(33);
%%IKr
xrf = X(34);  xrs = X(35);
%%IKs
xs1 = X(36);  xs2 = X(37);
%%IK1
xk1 = X(38);
%%Fluxes

%%CaMKt
CaMKt=X(41);
%%NEW STATE VARIABLES
nasl=X(42);  casl=X(43);  cacsr=X(44);
u=X(45);  Jrel1=X(46);  Jrel2=X(47);
ksl=X(48);
i=X(49);  i2=X(50);
b=X(51);  g=X(52);
y=X(53);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Extracellular Ionic Concentrations [mM]
if length(cEx)==1
    cao = cEx;  %[Ca]o mM
    nao = cEx(2);  %[Na]o mM
    ko = cEx(3);  %[K]o mM
elseif length(cEx)==2
    cao = cEx(1);  %[Ca]o mM
    nao = cEx(2);  %[Na]o mM
    ko = cEx(3);  %[K]o mM
elseif length(cEx)==3
    cao = cEx(1);  %[Ca]o mM
    nao = cEx(2);  %[Na]o mM
    ko = cEx(3);  %[K]o mM
else
    error('Extracellular Concentrations Error!!!');
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Physical Constants:
R = 8314.0;  % J/kmol/K
T = 310.0;  % K
F = 96485.0;  % C/mol
vffrt = v*F*F/(R*T);
vfirt = v*F/(R*T);
%% Valence of ionics
zna = 1;
zk = 1;
zca = 2;

```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Cell Geometry from ORd
% Cell geometry was approxymate by a cylinder of length L and radius r
L = 0.0164; % cm
rad = 0.00175; % cm
vcell = 1000*pi*rad^2*L; % uL
% Geometric Area
Ageo = 2*pi*rad^2 + 2*pi*rad*L; % cm^2
% Capacitive Area
Acap = 2*Ageo; % cm^2
% Compartment Volumes (4)
vmyo = 0.60*vcell; % uL
vnsr = 0.04*vcell; % uL
vjsr = 0.002*vcell; % uL
vcsr = 0.008*vcell;
vss = 0.02*vcell; % uL
vsl = 0.15*vcell;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Reversal Potentials
ENa = (R*T/F)*log(nao/nasl);
EK = (R*T/F)*log(ko/ksl);
ECa = (R*T/(zca*F))*log(cao/casl);
PKNa = 0.01833;
EKs = (R*T/F)*log((ko+PKNa*nao)/(ksl+PKNa*nasl));
%% Calcium_Fluxes_rate_constants from PRd
tautr1 = 120;
tautr2 = 120;
gaptau = 12;
sstau = 0.2;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% CaMK Constants
KmCaMK = 0.15; %%in PRd --> kmcamk
aCaMK = 0.05; %%In PRd --> alphacamk
bCaMK = 0.00068; %%in PRd --> betacamk
CaMKo = 0.05; %%in PRd --> camk0
KmCaM = 0.0015; %%In PRd --> kmcam
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% update CaMK -> X(41)
CaMKb = CaMKo*(1.0-CaMKt) / (1.0+KmCaM/cass);
CaMKa = CaMKb+CaMKt;
dCaMKt = aCaMK*CaMKb*(CaMKb+CaMKt) - bCaMK*CaMKt;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% MEMBRANE IONIC CURRENTS %%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% INa current from ORd
mss=1.0/(1.0+exp((-v+39.57)/9.871));
tm=1.0/(6.765*exp((v+11.64)/34.77)+8.552*exp(-(v+77.42)/5.955));
hss=1.0/(1+exp((v+78.5)/6.22));
thf=1.0/(1.432e-5*exp(-(v+1.196)/6.285)+6.149*exp((v+0.5096)/20.27));
ths=1.0/(0.009794*exp(-(v+17.95)/28.05)+0.3343*exp((v+5.730)/56.66));
Ahf=0.99;
Ahs=1.0-Ahf;
h=Ahf*hf+Ahs*hs;
jss=hss;
tj=2.038+1.0/(0.02136*exp(-(v+100.6)/8.281)+0.3052*exp((v+0.9941)/38.45));
hssp=1.0/(1+exp((v+84.7)/6.22));
thsp=3.0*ths;
hp=Ahf*hf+Ahs*hsp;
tjp=1.46*tj;
dm=(mss-m)/tm;
dhf=(hss-hf)/thf;
dhs=(hss-hs)/ths;
dj=(jss-j)/tj;
dhsp=(hssp-hsp)/thsp;

```

```

djp=(jss-jp)/tjp;
GNa=pop(1)*75*1.3;
fINap=(1.0/(1.0+KmCaMK/CaMKa));
INa=GNa*(v-ENa)*m^3.0*((1.0-fINap)*h*j+fINap*hp*jp);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% INaL current from ORd
mLss=1.0/(1.0+exp(-(v+42.85))/5.264));
tmL=tm;
hLss=1.0/(1.0+exp((v+87.61)/7.488));
thL=200.0;
hLssp=1.0/(1.0+exp((v+93.81)/7.488));
thLp=3.0*thL;
dmL=(mLss-mL)/tmL;
dhL=(hLss-hL)/thL;
dhLp=(hLssp-hLp)/thLp;
GNaL=pop(2)*0.0075*2.6;
fINaLp=(1.0/(1.0+KmCaMK/CaMKa));
INaL=GNaL*(v-ENa)*mL*((1.0-fINaLp)*hL+fINaLp*hLp);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% ICaL from ORd
dss=1.0/(1.0+exp(-(v+3.940))/4.230));
td=0.6+1.0/(exp(-0.05*(v+6.0))+exp(0.09*(v+14.0)));
fss=1.0/(1.0+exp((v+19.58)/3.696));
tff=7.0+1.0/(0.0045*exp(-(v+20.0)/10.0)+0.0045*exp((v+20.0)/10.0));
% tfs=1000.0+1.0/(0.000035*exp(-(v+5.0)/4.0)+0.000035*exp((v+5.0)/6.0)); %
ORd
tfs=1000.0+1.0/(0.000035*exp(-(v+5.0)/4.0)+0.000035*exp((v+5.0)/4.0));
% MOD
Aff=0.6;
Afs=1.0-Aff;
f=Aff*ff+Afs*fs;
fcass=fss;
tfcaf=7.0+1.0/(0.04*exp(-(v-4.0)/7.0)+0.04*exp((v-4.0)/7.0));
% tfcas=100.0+1.0/(0.00012*exp(-v/3.0)+0.00012*exp(v/7.0)); % ORd
tfcas=100.0+1.0/(0.00012*exp(-(v)/3.0)+0.00012*exp((v)/3.0)); % MOD
Afcaf=0.3+0.6/(1.0+exp((v-10.0)/10.0));
Afcas=1.0-Afcaf;
fca=Afcaf*fcaf+Afcas*fcas;
tjca=75.0;
ktaup=2.5;
tffp=ktaup*tff;
fp=Aff*fpp+Afs*fs;
tfcafp=ktaup*tfcaf;
fcap=Afcaf*fcafp+Afcas*fcas;
Kmn=0.002;
k2n=1000.0;
km2n=jca*1.0;
anca=1.0/(k2n/km2n+(1.0+Kmn/cass)^4.0);
dnca=(anca*k2n-nca*km2n);
PhiCaL=4.0*vffrt*(cass*exp(2.0*vffrt)-0.341*cao)/(exp(2.0*vffrt)-1.0);
PhiCaNa=1.0*vffrt*(0.75*nass*exp(1.0*vffrt)-0.75*nao)/(exp(1.0*vffrt)-1.0);
PhiCaK=1.0*vffrt*(0.75*kss*exp(1.0*vffrt)-0.75*ko)/(exp(1.0*vffrt)-1.0);
PCa=pop(3)*0.0001;
PCap=1.1*PCa;
PCaNa=0.00125*PCa;
PCaK=3.574e-4*PCa;
PCaNap=0.00125*PCap;
PCaKp=3.574e-4*PCap;
dd=(dss-d)/td;
dff=(fss-ff)/tff;
dfs=(fss-fs)/tfs;
dfcaf=(fcass-fcaf)/tfcaf;
dfcas=(fcass-fcas)/tfcas;
djca=(fcass-jca)/tjca;

```



```

dffp=(fss-ffp)/tffp;
dfcafp=(fcass-fcafp)/tfcafp;
fICaLp=(1.0/(1.0+KmCaMK/CaMKa));
ical1=(1.0-fICaLp)*PCa*PhiCaL*d*(f*(1.0-nca));
ical2=(1.0-fICaLp)*PCa*PhiCaL*d*(jca*fca*nca);
ical3=fICaLp*PCap*PhiCaL*d*(fp*(1.0-nca));
ical4=fICaLp*PCap*PhiCaL*d*(jca*fcap*nca);
% ICaL=ical1+ical2+ical3+ical4;
ICaL=((1.0-fICaLp)*PCa*PhiCaL*d*(f*(1.0-nca)+jca*fca*nca)+...
      fICaLp*PCap*PhiCaL*d*(fp*(1.0-nca)+jca*fcap*nca));
ICaNa=((1.0-fICaLp)*PCaNa*PhiCaNa*d*(f*(1.0-nca)+jca*fca*nca)+...
      fICaLp*PCaNap*PhiCaNa*d*(fp*(1.0-nca)+jca*fcap*nca));
ICaK=((1.0-fICaLp)*PCaK*PhiCaK*d*(f*(1.0-nca)+jca*fca*nca)+...
      fICaLp*PCaKp*PhiCaK*d*(fp*(1.0-nca)+jca*fcap*nca));
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% T_type_calcium_current_ICaT from PRd
gcat= pop(4)*0.07875;
bss= 1/(1+ exp(-(v+30)/7));
gss= 1/(1+exp((v+61)/5));
taub= 1/(1.068*exp((v+16.3)/30)+1.068*exp(-(v+16.3)/30));
taug= 1/(0.015*exp(-(v+71.7)/83.3)+0.015*exp((v+71.7)/15.4));
db= (bss-b)/taub;
dg= (gss-g)/taug;
ICaT= gcat*b*g*(v-ECa);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Ito current from Han's data
gtos= pop(5)*0.2755;
ass= 1.0/(1.0+exp((20.0-v)/13.0));
iss= 1.0/(1.0+exp((v+27.0)/13.0));
i2ss= iss;
atau= 10.45*exp(-(v+40.0)^2.0/1800.0)+7.3;
itau= 85.0*exp(-(v+25.0)^2.0/320.0)+5.0/(1.0+exp((v-40.0)/5.0))+42.0;
i2tau= 37.0*exp(-(v+81.0)^2.0/197.0)+5.36/(1.0+exp((v-18)/7))+6.3;
da= (ass-a)/atau;
di= (iss-i)/itau;
di2= (i2ss-i2)/i2tau;
Ito= gtos*a*i*i2*(v-EK);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Sustained_outward_current from Han's data
g_sus=pop(6)*0.0235; %from Han's data
asus = 1.0/(1.0+exp(-(v-12)/16.0));
Isus= g_sus*asus*(v-EK);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% IKr current from PRd
xrss=1.0/(1.0+exp((-v+8.337)/6.789));
txrf=12.98+1.0/(0.3652*exp((v-31.66)/3.869)+4.123e-5*exp((-v-
47.78)/20.38));
txrs=1.865+1.0/(0.06629*exp((v-34.70)/7.355)+1.128e-5*exp((-v-
29.74)/25.94));
Axrf=1.0/(1.0+exp((v+54.81)/38.21));
Axrs=1.0-Axrf;
dxrf=(xrss-xrf)/txrf;
dxrs=(xrss-xrs)/txrs;
xr=Axrf*xrf+Axrs*xrs;
rkr=1.0/(1.0+exp((v+55.0)/75.0))*1.0/(1.0+exp((v-10.0)/30.0));
GKr=pop(7)*0.046;
IKr=GKr*sqrt(ko/5.4)*xr*rkr*(v-EK);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% IKs current from ORd
xs1ss=1.0/(1.0+exp((-v+11.60)/8.932));
txs1=817.3+1.0/(2.326e-4*exp((v+48.28)/17.80)+0.001292*exp((-
(v+210.0)/230.0));
dxs1=(xs1ss-xs1)/txs1;
xs2ss=xs1ss;

```

```

txs2=1.0/(0.01*exp((v-50.0)/20.0)+0.0193*exp((-v+66.54)/31.0));
dxs2=(xs2ss-xs2)/txs2;
KsCa=1.0+0.6/(1.0+(3.8e-5/cas1)^1.4);
GKS=pop(8)*0.0034;
IKs=GKS*KsCa*xs1*xs2*(v-EKs);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Hyper-polarization Activated Current (If) from Stewart's formulation
with Han's data
gfK = pop(9)*0.0234346;
gfNa = pop(9)*0.0145654;
alpha_y = 1.0*exp(-2.9-0.04*v);
beta_y = 1.0*exp(3.6+0.11*v);
tau_y = 4000.0/(alpha_y+beta_y);
yss = 1.0/(1.0+exp((v+80.6)/6.8));
dy = (yss-y)/tau_y;
IfK = y*gfK*(v-EK);
IfNa = y*gfNa*(v-ENa);
If = IfNa+IfK;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% IK1 current from ORD's formulation with Han's data
gk1=pop(10)*0.1267*sqrt((ko)/5.4);
xk1ss=1.0/(1.0+exp(-(v+2.5538*ko+144.59)/(1.5692*ko+3.8115)));
xk1tau=122.2/(exp(-(v+127.2)/20.36)+exp((v+236.8)/69.33));
dxk1=(xk1ss-xk1)/xk1tau;
rk1=1/(1.0+exp((v+116-5.5*ko)/11)); %New Formulation
IK1=gk1*rk1*xk1*(v-EK);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% INaCa current
kna1=15.0;      kna2=5.0;      kna3=88.12;      kasymm=12.5;
wna=6.0e4;      wca=6.0e4;      wnaca=5.0e3;      KmCaAct=150.0e-6;
kcaon=1.5e6;    kcaoff=5.0e3;   qna=0.5224;      qca=0.1670;
zna=1.0;        Gncx=pop(11)*0.0008;      zca=2.0;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% INaCa_i current
hca=exp((qca*v*F)/(R*T));      hna=exp((qna*v*F)/(R*T));
h1=1+na1/kna3*(1+hna);          h2=(na1*hna)/(kna3*h1);
h3=1.0/h1;                      h4=1.0+na1/kna1*(1+na1/kna2);
h5=na1*na1/(h4*kna1*kna2);      h6=1.0/h4;
h7=1.0+nao/kna3*(1.0+1.0/hna);  h8=nao/(kna3*hna*h7);
h9=1.0/h7;                      h10=kasymm+1.0+nao/kna1*(1.0+nao/kna2);
h11=nao*nao/(h10*kna1*kna2);    h12=1.0/h10;

k1=h12*cao*kcaon;   k2=kcaoff;      k3p=h9*wca;      k3pp=h8*wnaca;
k3=k3p+k3pp;        k4p=h3*wca/hca;  k4pp=h2*wnaca;   k4=k4p+k4pp;
k5=kcaoff;          k6=h6*cas1*kcaon; k7=h5*h2*wna;    k8=h8*h11*wna;

x1=k2*k4*(k7+k6)+k5*k7*(k2+k3); x2=k1*k7*(k4+k5)+k4*k6*(k1+k8);
x3=k1*k3*(k7+k6)+k8*k6*(k2+k3); x4=k2*k8*(k4+k5)+k3*k5*(k1+k8);

E1=x1/(x1+x2+x3+x4);   E2=x2/(x1+x2+x3+x4);
E3=x3/(x1+x2+x3+x4);   E4=x4/(x1+x2+x3+x4);

allo=1.0/(1.0+(KmCaAct/cas1)^2.0);
JncxNa=3.0*(E4*k7-E1*k8)+E3*k4pp-E2*k3pp;
JncxCa=E2*k2-E1*k1;
%
INaCa_i=0.8*Gncx*allo*(zna*JncxNa+zca*JncxCa);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% INaCa_ss current
h1=1+nass/kna3*(1+hna);          h2=(nass*hna)/(kna3*h1);
h3=1.0/h1;                      h4=1.0+nass/kna1*(1+nass/kna2);
h5=nass*nass/(h4*kna1*kna2);     h6=1.0/h4;
h7=1.0+nao/kna3*(1.0+1.0/hna);  h8=nao/(kna3*hna*h7);

```

```

h9=1.0/h7; h10=kasymm+1.0+nao/kna1*(1+nao/kna2);
h11=nao*nao/(h10*kna1*kna2); h12=1.0/h10;

k1=h12*cao*kcaon; k2=kcaoff; k3p=h9*wca; k3pp=h8*wnaca;
k3=k3p+k3pp; k4p=h3*wca/hca; k4pp=h2*wnaca; k4=k4p+k4pp;
k5=kcaoff; k6=h6*cass*kcaon; k7=h5*h2*wna; k8=h8*h11*wna;

x1=k2*k4*(k7+k6)+k5*k7*(k2+k3); x2=k1*k7*(k4+k5)+k4*k6*(k1+k8);
x3=k1*k3*(k7+k6)+k8*k6*(k2+k3); x4=k2*k8*(k4+k5)+k3*k5*(k1+k8);

E1=x1/(x1+x2+x3+x4); E2=x2/(x1+x2+x3+x4);
E3=x3/(x1+x2+x3+x4); E4=x4/(x1+x2+x3+x4);

allo=1.0/(1.0+(KmCaAct/cass)^2.0);
JncxNa=3.0*(E4*k7-E1*k8)+E3*k4pp-E2*k3pp;
JncxCa=E2*k2-E1*k1;
%
INaCa_ss=0.2*Gncx*allo*(zna*JncxNa+zca*JncxCa);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% INaK current from ORd
k1p=949.5; k1m=182.4; k2p=687.2; k2m=39.4;
k3p=1899.0; k3m=79300.0; k4p=639.0; k4m=40.0;
Knaio=9.073; Knao0=27.78; delta2=-0.1550;
Knaio=Knaio*exp((delta2*v*F)/(3.0*R*T));
Knao0=Knao0*exp(((1.0-delta2)*v*F)/(3.0*R*T));
Kki=0.5; Kko=0.3582; MgADP=0.05; MgATP=9.8;
Kmgatp=1.698e-7; H=1.0e-7; eP=4.2; Khp=1.698e-7;
Knap=224.0; Kxkur=292.0;
P=eP/(1.0+H/Khp+nai/Knap+ki/Kxkur);

a1=(k1p*(nasl/Knai)^3.0)/((1.0+nasl/Knai)^3.0+(1.0+ksl/Kki)^2.0-1.0);
b1=k1m*MgADP;
a2=k2p;
b2=(k2m*(nao/Knao)^3.0)/((1.0+nao/Knao)^3.0+(1.0+ko/Kko)^2.0-1.0);
a3=(k3p*(ko/Kko)^2.0)/((1.0+nao/Knao)^3.0+(1.0+ko/Kko)^2.0-1.0);
b3=(k3m*P*H)/(1.0+MgATP/Kmgatp);
a4=(k4p*MgATP/Kmgatp)/(1.0+MgATP/Kmgatp);
b4=(k4m*(ksl/Kki)^2.0)/((1.0+nasl/Knai)^3.0+(1.0+ksl/Kki)^2.0-1.0);

x1=a4*a1*a2+b2*b4*b3+a2*b4*b3+b3*a1*a2;
x2=b2*b1*b4+a1*a2*a3+a3*b1*b4+a2*a3*b4;
x3=a2*a3*a4+b3*b2*b1+b2*b1*a4+a3*a4*b1;
x4=b4*b3*b2+a3*a4*a1+b2*a4*a1+b3*b2*a1;

E1=x1/(x1+x2+x3+x4); E2=x2/(x1+x2+x3+x4);
E3=x3/(x1+x2+x3+x4); E4=x4/(x1+x2+x3+x4);
zk=1.0; JnakNa=3.0*(E1*a3-E2*b3); JnakK=2.0*(E4*b1-E3*a1);
Pnak=pop(12)*30;
INaK=Pnak*(zna*JnakNa+zK*JnakK);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Background currents: IKb, INab, ICab from ORd
% IKb current
xkb = 1.0 / (1.0+exp(-(v-14.48)/18.34));
GKb = 0.003;
IKb = GKb*xkb*(v-EK);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% INab current
PNab = 3.75e-10;
INab = PNab*vffrt*(nasl*exp(vfirt)-nao)/(exp(vfirt)-1.0);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% ICab current
PCab = 2.5e-8;
ICab = PCab*4.0*vffrt*(casl*exp(2.0*vfirt)-0.341*cao)/(exp(2.0*vfirt)-1.0);

```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% IpCa current from ORd
GpCa = 0.0005;
IpCa = GpCa*cai/(0.0005+cai);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Simulation Procotols
switch pstim(1)
case 0
% 0 - No stimulation
Istim=0.0;
dv = - (INa+INaL+Ito+Isus+ICaL+ICaNa+ICaK+ICaT+If+IKr+IKs+IK1+...
        INaCa_i+INaCa_ss+INaK+INab+IKb+IpCa+ICab+Istim);
case 1
% 1 - Current_Clamp -> Single Istim current
amp = -40;
duration = 1;
if t <= duration
    Istim = amp;
else
    Istim = 0.0;
end
% update V -> X(1)
dv = - (INa+INaL+Ito+Isus+ICaL+ICaNa+ICaK+ICaT+If+IKr+IKs+IK1+...
        INaCa_i+INaCa_ss+INaK+INab+IKb+IpCa+ICab+Istim);
case 2
% 2 - Current_Clamp -> Istim current with fixed CL
CL = pstim(2);
amp = -40;
duration = 1;
trem = mod(t,CL);
if trem <= duration
    Istim = amp;
else
    Istim = 0.0;
end
% update V -> X(1)
dv = - (INa+INaL+Ito+Isus+ICaL+ICaNa+ICaK+ICaT+If+IKr+IKs+IK1+...
        INaCa_i+INaCa_ss+INaK+INab+IKb+IpCa+ICab+Istim);
case 3
% 3 - Voltage_Clamp (Ely), with single Vclamp-step
Istim = 0;
% update V -> X(1)
dv = 0;
case 4
% 4 - Voltage_Clamp (Grandi), with single Vclamp-step
Rclamp=0.02;
Istim = (v-pstim(2))/Rclamp;
% update V -> X(1)
dv = - (INa+INaL+Ito+Isus+ICaL+ICaNa+ICaK+ICaT+If+IKr+IKs+IK1+...
        INaCa_i+INaCa_ss+INaK+INab+IKb+IpCa+ICab+Istim);
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% SR_CA_FLUXES from PRd
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Diffusion Fluxes
JdiffNa= (nass-nasl)/sstau;
JgapNa=(nasl-nai)/gaptau;
JdiffK= (kss-ksl)/sstau;
JgapK=(ksl-ki)/gaptau;
Jdiff = (cass-casl)/sstau;
Jgap = (casl-cai)/gaptau;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Ip3R_Ca_Release

```

```

IP3 = 0.0001;
k1 = 150000;
k1a = 16.5;
k0 = 96000;
k0a = 9.6;
k2 = 1800;
k2a = 0.21;
taup3r = 3.7;
du=(cass*k2*(1-u)-k2a*u);
POip3 = taup3r*IP3*cass*(1-u)/((1+IP3*k0/k0a)*(1+cass*k1/k1a));
Jip3 = pop(13)*10.920*(cajsr-cass)*(POip3);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Ca_uptake_via_SERCA: qup1 & qup2
dqupcamkbar = 0.75;
dkmplbbar = 0.00017;
kmup = 0.00028;
nsrbar = 15.0;
dkmplb = dkmplbbar*CaMKa/(KmCaMK+CaMKa);
dqupcamk = dqupcamkbar*CaMKa/(KmCaMK+CaMKa);
Jup1 = pop(14)*0.0002*(dqupcamk+1)/(1+((kmup-dkmplb)/casl))-
0.00105*cansr/nsrbar;
Jup2 = pop(14)*0.0026*(dqupcamk+1)/(1+((kmup-dkmplb)/cai))-
0.0042*cansr/nsrbar;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% RyR3_Ca_Release: qrel1
REL = -((ICaL)*Acap/(vss*2.0*F)-(Jrel1 + Jip3)*vjsr/vss + Jdiff);
ireltau = 2*(1+1*(1/(1+((0.28/CaMKa)^8))))/(1+(0.0123/cajsr));
if (REL > 0)
    irelss = pop(13)*15*(1+1*(1/(1+((0.28/CaMKa)^8))))*REL/(1 +
((1.0/cajsr)^8));
else
    irelss = 0;
end
dJrel1= ((irelss-Jrel1)/ireltau);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% RyR2_Ca_release: qrel2
REL = (-Jup2*vnsr/vmyo + Jgap*vsl/vmyo+ (Jrel2)*vcsr/vmyo);
ireltau = 6*(1+1*(1/(1+((0.28/CaMKa)^8))))/(1+(0.0123/cacsr));
if (REL > 0)
    irelss = pop(13)*91*(1+1*(1/(1+((0.28/CaMKa)^8))))*(REL)/(1 +
((1/cacsr)^8));
else
    irelss = 0;
end
dJrel2= ((irelss-Jrel2)/ireltau);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Tranlocation Flux
Jtr1=(cansr-cajsr)/tautr1;
Jtr2=(cansr-cacsr)/tautr2;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Calcium Buffer Constants
%BSR
BSRmax=0.019975;
KmBSR=0.00087;
%BSL
BSLmax=0.4777;
KmBSL=0.0087;
%CSQN
csqnmax= 2.88;
kmcsqn=0.8;
csqnmax1 = 1.2;
%CMDN
cmdnmax=0.1125;
kmcmdn=0.00238;

```

```

cmdnmax1 = 1.25e-2;
%TRPM
trpnmax=3.15e-2;
kmtrpn=0.0005;
trpnmax1 = 3.5e-3;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%                                IONIC CONCENTRATIONS                                %%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% [Na]
if cIn_cost(1)==0
dnass=-(ICaNa+3.0*INaCa_ss)*Acap/(F*vss*zna)-JdiffNa;
dnasl=-
(INa+INaL+3.0*INaCa_i+3.0*INaK+IfNa+INab)*Acap/(F*vsl*zna)+JdiffNa*vss/vsl-
JgapNa;
dnai=JgapNa*vsl/vmyo;
else
    dnasl=0;
    dnass=0;
    dnai=0;
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% [K]
if cIn_cost(2)==0
dkss=-JdiffK;
dksl=-(Ito+Isus+IKr+IKs+IKl+IKb+Istim-
2.0*INaK+IfK)*Acap/(F*vsl*zk)+JdiffK*vss/vsl -JgapK;
dki=JgapK*vsl/vmyo;
else
    dkss=0;
    dksl=0;
    dki=0;
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% [Ca]_i (Ca_concentration in Myo)
trpnMYO=trpnmax*kmtrpn/(kmtrpn+cai)^2.0;
cmdnMYO=cmdnmax*kmcmdn/(kmcmdn+cai)^2.0;
Bcai = 1.0 / (1.0+cmdnMYO+trpnMYO);
dcaibar= -(Jup2)*vnsr/vmyo+Jgap*vsl/vmyo+(Jrel2)*vcsr/vmyo;
dcai = Bcai*dcaibar;
%% [Ca]_PCS
Bcass =
1.0/(1.0+BSRmax*KmBSR/(KmBSR+cass)^2.0+BSLmax*KmBSL/(KmBSL+cass)^2.0);
dcass = Bcass*(-(ICaL-
2.0*INaCa_ss)*Acap/(2.0*F*vss)+(Jrel1+Jip3)*vjrs/vss-Jdiff);
%% [Ca]_SSL
dcaslbar= -(Jup1)*vnsr/vsl+Jdiff*vss/vsl-Jgap-(ICaT+IpCa+ICab-
2*INaCa_i)*Acap/(vsl*2.0*F);
trpnSSL=(trpnmax1*kmtrpn)/((kmtrpn+casl)^2);
cmdnSSL=(cmdnmax1*kmcmdn)/((kmcmdn+casl)^2);
Bcasl=1/(1+trpnSSL+cmdnSSL);
dcasl=Bcasl*dcaslbar;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% [Ca]_NSR
dcansr= Jup1+Jup2-Jtr1*vjsr/vnsr-Jtr2*vcsr/vnsr;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% [Ca]_JSR
dcajsrbar=(Jtr1-Jrel1-Jip3);
csqn1=(csqnmax1*kmcsqn)/((kmcsqn+cajsr)^2);
Bcajsr = 1.0/(1.0+csqn1);
dcajsr = Bcajsr*dcajsrbar;
%% [Ca]_CSR
dcacsrbar=(Jtr2-Jrel2);
csqn=(csqnmax*kmcsqn)/((cacsr+kmcsqn)^2);
Bcacsr=1/(1+csqn);

```

```

dcacsr=Bcacsr*dcacsrbar;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Output Computation
% When flag==1 -> dX
if flag_ode==1 %file delle variabili di stato, in y o OR
    output= [dv      dnai      dnass      dki      dkss...      %1
             dcai      dcass      dcansr      dcajsr      dm...      %2
             dhf      dhs      dj      dhsp      djp...      %3
             dmL      dhL      dhLp      da      0 ...      %4
             0      0      0      0      dd ...      %5
             dff      dfs      dfcaf      dfcas      djca...      %6
             dnca      dffp      dfcafp      dxrf      dxrs...      %7
             dxs1      dxs2      dxk1      0      0 ...      %8
             dCaMKt      dnasl      dcasl      dcacsr      du...      %9
             dJrel1      dJrel2      dksl      di      di2...      %10
             db      dg      dy      0]';      %11

% When flag==0 -> Computed Variables: currents, concentrations and fluxes
else %variabili compute, in CVS
    output=[ INa      INaL      Ito      ICaL      IKr...      %1
             IKs      IK1      INaCa_i      INaCa_ss      INaK...      %2
             IKb      INab      ICab      IpCa      Jdiff...      %3
             JdiffNa      JdiffK      Jip3      Jtr1      Jtr2...      %4
             Jrel1      Jrel2      Istim      ICaK      ICaNa...      %5
             0      0      0      0      0 ...      %6
             Jup1      Jup2      0      fss      dss...      %7
             0      0      0      0      0 ...      %8
             0      0      0      0      0 ...      %9
             1-fss      1-fss      fss      fss      fss...      %10 50
             0      fss      0      Isus      ICaT...      %11
             If      IfNa      IfK      alpha_y      beta_y...      %12 60
             tau_y      yss      y      m      mss...      %13
             h      hss      j      jss      mL...      %14 70
             mLss      hL      hLss      hLp      hLssp...      %15
             d      dss      fss      ff      fs...      %16 80
             fcac      fcac      ffp      jca      nca...      %17 85
             anca      td      tff      tfs      tfcaf...      %18 90
             tfcas      PhiCaL      d*f      d*jca*fca*nca      d*fp...      %19
             d*jca*fcap*nca      ical1      ical2      ical3      ical4...      %20
             nai      nasl      nass      ki      ksl...      %21
             kss      JdiffNa      JgapNa      JdiffK      JgapK...      %22
             Jdiff      Jgap]';
end

```


Ringraziamenti